

# **Charakterisierung der proteasomalen Genregulation unter Biogeneseaspekten**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Biologe Dirk Heyken  
geb. 07. 04. 1975, Wuppertal

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:     1. Prof. Dr. Peter-Michael Koetzel  
                  2. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel  
                  3. Prof. Dr. Harald Saumweber

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2005

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>I</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>II</b> |
| <b>1 EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Das Proteasomensystem.....  | 1         |
| 1.2 Die Biogenese des 20S Proteasoms .....  | 3         |
| 1.2.1 Helferproteine bei der Proteasombiogenese.....  | 5         |
| 1.3 Interferon $\gamma$ und die Rolle des 26S Proteasoms für die Immunantwort .....         | 7         |
| 1.3.1 Interferon $\gamma$ <i>cis-acting</i> DNA-Elemente .....                              | 8         |
| 1.4 Proteasom-Inhibitoren.....  | 9         |
| 1.5 Regulation von proteasomalen Genen in Mammalia und Homologe in Hefe und Bakterien ..... | 11        |
| 1.6 Oxidativer Stress .....   | 13        |
| 1.7 Ziel der Arbeit .....   | 15        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1 Material .....  | 17        |
| 2.1.1 Oligonukleotide.....  | 17        |
| 2.1.1.1 Oligonukleotide für EMSA .....  | 18        |
| 2.1.2 Geräte .....  | 19        |
| 2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....   | 20        |
| 2.1.4 Kits .....  | 20        |
| 2.1.5 Verwendete Antikörper .....   | 20        |
| 2.1.6 Vektoren.....   | 21        |
| 2.2 Methoden.....   | 21        |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.2.1     | Molekularbiologische Methoden.....  | 21 |
| 2.2.1.1   | Klonierungsmethoden .....   | 21 |
| 2.2.1.1.1 | Restriktion von DNA .....   | 21 |
| 2.2.1.1.2 | Präparation von Klonierungsvektoren.....                                  | 21 |
| 2.2.1.2   | Dephosphorylierung von kompatiblen Enden.....                             | 22 |
| 2.2.1.3   | Ligation .....  | 22 |
| 2.2.1.4   | Transformation von Bakterienzellen.....                                   | 22 |
| 2.2.1.5   | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Zellen (vom DH5 $\alpha$ -Typ)..... | 23 |
| 2.2.2     | Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....                       | 23 |
| 2.2.2.1   | Kochpräparation .....   | 23 |
| 2.2.2.2   | Miniprep (Qiagen).....  | 24 |
| 2.2.2.3   | Agarose-Gelelektrophorese .....   | 24 |
| 2.2.3     | PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) .....                            | 24 |
| 2.2.3.1   | RT-PCR.....   | 25 |
| 2.2.4     | Northern Hybridisierung .....   | 25 |
| 2.2.4.1   | RNA Isolation aus Säugetier - Zellen .....                                | 25 |
| 2.2.4.2   | Herstellung von DIG-RNA Sonden .....                                      | 26 |
| 2.2.4.3   | Northern Blot.....  | 27 |
| 2.2.5     | Exonuclease III Verdau .....  | 28 |
| 2.2.6     | EMSA .....  | 29 |
| 2.2.7     | Zellkultur .....  | 30 |
| 2.2.7.1   | Zelllinien .....  | 30 |
| 2.2.7.2   | Medien für humane Zelllinien.....   | 30 |
| 2.2.7.3   | Kultur von adhärenenten Zellen.....                                       | 30 |
| 2.2.7.4   | Kultur von Suspensionszellen .....  | 31 |
| 2.2.7.5   | Einfrieren und Auftauen von Zellen.....                                   | 31 |
| 2.2.7.6   | Behandlung von Kulturzellen mit Proteasom - Inhibitor .....               | 31 |
| 2.2.7.7   | Behandlung von Kulturzellen mit $\alpha$ - Amanitin .....                 | 32 |
| 2.2.7.8   | Transfektion von adhärenenten Zellen.....                                 | 32 |
| 2.2.7.9   | Markierung von Zellen mit $^{35}\text{S}$ .....                           | 32 |
| 2.2.7.10  | Aktivitätsbestimmung der Luziferase .....                                 | 32 |
| 2.2.7.11  | Aktivitätsbestimmung der Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)...       | 33 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.2.7.12 | Kernprotein-Extraktion .....  | 33        |
| 2.2.7.13 | Hitze Schock an transfizierten HUVEC .....  | 34        |
| 2.2.8    | Proteinbiochemische Methoden .....  | 34        |
| 2.2.8.1  | SDS PAGE (SDS – Polyacrylamidelectrophorese) nach Lämmli .....                                      | 34        |
| 2.2.8.2  | Western Blot Analyse.....   | 35        |
| 2.2.8.3  | Dichtegradientenzentrifugation.....   | 36        |
| 2.2.8.4  | Immunopräzipitation .....   | 36        |
| 2.2.8.5  | Aktivitätsbestimmung des Proteasoms.....  | 37        |
| 2.2.8.6  | Proteinbestimmung.....  | 37        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>38</b> |
| 3.1      | Regulation von POMP durch Interferon $\gamma$ .....   | 38        |
| 3.1.1    | Genstruktur von POMP .....  | 38        |
| 3.1.2    | Reportergenfusion des putativen POMP Promotors .....  | 41        |
| 3.2      | Konzertierte Transkript-Induktion proteasomaler Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren .....    | 50        |
| 3.2.1    | Analyse der Genexpression durch <i>real time</i> RT-PCR .....                                       | 50        |
| 3.2.2    | Die Induktion auf transkriptioneller Ebene .....  | 52        |
| 3.2.3    | Induktion auf Proteinebene .....  | 55        |
| 3.2.4    | Beeinflussung der POMP Expression und der Proteasom Biogenese durch Inhibition des Proteasoms ..... | 58        |
| 3.2.5    | $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Analysen durch Reportergenfusion .....                                  | 62        |
| 3.2.6    | <i>Heat Shock Element</i> und <i>Antioxidanz Response Element</i> .....                             | 66        |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>73</b> |
| 4.1      | Die Genstruktur von POMP .....  | 73        |
| 4.2      | Interferon $\gamma$ vermittelt keine Induktion der Transkription von POMP.....                      | 74        |
| 4.3      | Induktion proteasomaler Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren.....                             | 78        |
| 4.3.1    | Proteasom-Inhibitoren induzieren die Expression proteasomaler                                       |           |

## INHALTSVERZEICHNIS

---

|   |            |
|---|------------|
| Untereinheiten auf Ebene der Transkriptionsinitiation .....   | 79         |
| 4.3.2 Induktion der proteasomalen Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren auf Proteinebene ..... | 80         |
| 4.4 Untersuchung der Promotorregion von $\beta 1(\delta)$ durch Reportergenfusion und EMSA          |            |
| 82  |            |
| 4.4.1 Ausblick und Bedeutung .....  | 89         |
| <b>5 ANHANG.....</b>  | <b>90</b>  |
| <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>LEBENS LAUF .....</b>  | <b>111</b> |
| <b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>  | <b>112</b> |
| <b>DANKSAGUNG .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>ERKLÄRUNG.....</b>   | <b>114</b> |
| <b>URHEBERRECHTSHINWEIS.....</b>  | <b>114</b> |
| <b>COPYRIGHT NOTICE.....</b>  | <b>114</b> |

## Zusammenfassung

Das 26S Proteasom ist ein großer Proteinase-Komplex, der aus 32 unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist. Das 26S Proteasom ist involviert in die ATP-abhängige Degradation von ubiquitinierten Proteinen, die eine Vielfalt an zellulären Prozessen wie Signaltransduktion, Stressantwort, transkriptionelle Regulation, Chromosomen-Segregation, DNA-Reparatur, Zellzyklus-Steuerung und die Prozessierung von Peptiden für die MHC I Antigen Präsentation regulieren. Die Prozessierung von Peptiden wird verstärkt durch eine Interferon  $\gamma$  stimulierbare Variante des Proteasoms übernommen, dem so genannten Immunoproteasom.

Die Biogenese dieses großen Komplexes ist ein komplizierter Mechanismus, welcher Expression und Assemblierung der proteasomalen Untereinheiten beinhaltet.

In Eukaryonten sind für die Assemblierung und Maturierungsprozesse Helferproteine notwendig. In Mammalia übernimmt diese Funktion das *Proteasom maturation Protein* POMP. POMP ist wahrscheinlich auch bei der Biogenese des Immunoproteasoms von Bedeutung, da die mRNA von POMP durch Interferon  $\gamma$  induziert wird. Um die Regulation dieser Induktion zu untersuchen wurde der Promotor von POMP für die erste Fragestellung dieser Arbeit charakterisiert und seine Induzierbarkeit durch Interferon  $\gamma$  untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhte mRNA-Menge durch Interferon  $\gamma$ -Stimulation nicht auf eine Promotor-Induktion, sondern auf post-transkriptionelle Ereignisse zurückzuführen ist.

In der zweiten Fragestellung dieser Arbeit sollte die Genregulation des Proteasoms unter Stressbedingungen untersucht werden. Der Stress wurde durch Inhibition der proteolytischen Aktivität des Proteasoms ausgelöst.

Wie seit längerem bekannt ist, werden in Bakterien und Hefe die ATP-abhängigen Proteasekomplexe über ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk gesteuert. Über die transkriptionelle Regulation des Mammalia Proteasoms war bisher wenig bekannt. Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der proteolytischen Aktivität des Proteasoms durch Behandlung von Mammalia-Zellen mit Proteasom-Inhibitoren durch eine gesteigerte Genexpression der proteasomalen Untereinheiten kompensiert wird. Alle proteasomalen Untereinheiten werden konzertiert hoch-

reguliert. Exemplarisch an der proteasomalen Untereinheit Rpt1(S7) und an dem Maturationfaktor POMP konnte eine posttranskriptionelle Regulation unter Proteasom-Inhibitor Einfluss ausgeschlossen werden. Die vom Inhibitor induzierte Genaktivierung resultiert in einer *de novo* Protein-Synthese und führt daher zu einer gesteigerten *de novo* Biogenese des Proteasoms. Dieses Phänomen ist begleitet durch eine vermehrte Expression vom POMP. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Menge an Proteasom in Mammalia auf transkriptioneller Ebene reguliert wird und dass vermutlich ein autoregulatorischer *feedback*-Mechanismus eine verminderte proteolytische Aktivität kompensieren kann. Diese Daten werden durch Ergebnisse der CAT-Reporter-Gen-Assays des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors gestützt. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität dieses Promotors in Anwesenheit von Proteasom-Inhibitoren ansteigt. Die induzierbare Promotorregion konnte bis auf 130 bp eingegrenzt werden. Innerhalb dieser Promotorsequenz konnte die Bindung eines Transkriptionsfaktors (Nrf2) durch EMSA-Technik nachgewiesen werden.

## Summary

The 26 S proteasome is a high molecular mass proteinase complex that is built by of least 32 different protein subunits. The 26S proteasome is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins that regulate a variety of cellular processes including signal transduction, stress response, transcriptional control, chromosome segregation, DNA repair, cell cycle progression and processing of antigenic Peptides for the MHC I pathway. Biogenesis of this large complex is a complicated process comprising expression, assembly and maturation of all subunits. This crucial step is supported by POMP (proteasome maturation protein). POMP mRNA is induced by Interferon gamma (IFN  $\gamma$ ). We investigated this phenomenon via Reporter-Gen assays with the Promoter region of POMP. POMP mRNA seems not to be regulated on a transcriptional level, but on posttranscriptional events.

ATP-dependent protease complexes in bacteria and yeast are systems that undergo a highly sophisticated network of gene expression regulation. However, regulation of mammalian proteasome gene expression has been neglected so far as a possible control

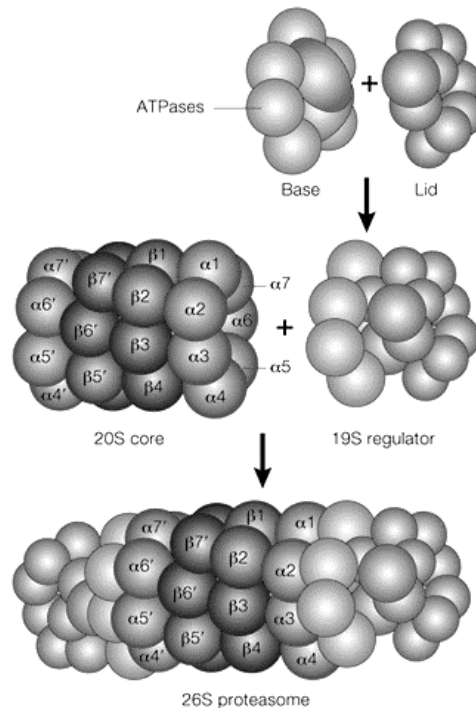
mechanism for the amount of proteasomes in the cell. We showed that treatment of cells with proteasome inhibitors and the concomitant impairment of proteasomal enzyme activity induce a transient and concerted up-regulation of all mammalian 26S proteasome subunit mRNAs. Proteasome inhibition in combination with inhibition of transcription revealed that the observed up-regulation is mediated by coordinated transcriptional activation of the proteasome genes and not by post-transcriptional events. Our experiments also demonstrate that inhibitor-induced proteasome gene activation results in enhanced *de novo* protein synthesis of all subunits and in increased *de novo* formation of the proteasome. This phenomenon is accompanied by enhanced expression of the proteasome maturation factor POMP. Thus, our experiments present first evidence that the amount of proteasomes in mammalia is regulated at the transcriptional level and that an auto regulatory feedback mechanism exists that allows the compensation of reduced proteasome activity. These data are also supported by CAT reportergene assays with the proteasomal subunit  $\beta 1(\delta)$ -promoter. Exemplary we show the increase of CAT activities in response to proteasome inhibition. We can restrict the region of the promoter to 130 bp and identify Nrf2 as a possible candidate for a transcription factor via EMSA.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Proteasomensystem

Das 26S Proteasom stellt neben den lysosomalen Proteasen das wichtigste Degradationssystem in eukaryotischen Zellen dar. Das Proteasom-System und seine homologen Komplexe findet man in allen drei biologischen Reichen. Die Struktur des Proteasoms ist konserviert (Gille, et al., 2003). In Eukaryoten ist das Proteasom aus dem proteolytisch aktivem 20S Kern und dem 19S Regulator (PA700) aufgebaut. Der gesamte Komplex wird als 26S Proteasom bezeichnet. Die selektive Proteindegradation wird über das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt (Hershko and Ciechanover, 1992). Die Spezifität dieses Systems wird über die Struktur des Proteasoms und die Markierung der Substrate mit Polyubiquitinketten über eine Enzymkaskade erreicht. Durch dieses System wird die Homöostase der meisten zellulären Proteine gewährleistet (Rock, et al., 1994). Zu den Substraten gehört eine Vielzahl von Proteinen, darunter falsch gefaltete, kurzlebige regulatorische, cytosolische sowie nukleäre Proteine. Durch diesen mannigfaltigen Proteinabbau nimmt das Proteasom Einfluss auf unterschiedlichste zelluläre Prozesse. So ist das Proteasom beteiligt an der Zellzykluskontrolle, hat Einfluss auf die Signaltransduktion, die Genregulation und die Generierung von Peptiden zur Antigenpräsentation, um nur einige Prozesse zu nennen (Coux, et al., 1996). Interferon  $\gamma$  induziert das so genannte Immunoproteasom, welches modifizierte katalytische Eigenschaften besitzt.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

#### Abb. 1: Struktur des 20S und 26S Proteasoms

Das 20S Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten, von denen 14 nicht identische Proteine sind. Die Untereinheiten gliedern sich in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die vier heptamere Ringe bilden und so einen Zylinder formen, der als 20S Proteasom (*Core*) bezeichnet wird. Das 26S Proteasom wird aus dem 20S Proteasom und dem 19S Regulator gebildet. Der 19S Regulator besteht aus *Base*- und *Lid*-Komponenten. (Abbildung aus (Kloetzel, 2001))

Die Struktur des Proteasoms ist in Abb. 1 dargestellt und wird im Folgenden erläutert. Das 20S Proteasom besteht bei Eukaryoten aus 28 Untereinheiten, die aufgrund von Sequenzhomologien in je 7 verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unterteilt werden (Heinemeyer, et al., 1994). Daraus ergeben sich 14 unterschiedliche Untereinheiten, die jeweils doppelt im 20S Proteasom vorhanden sind. Diese 28 Untereinheiten formen einen Zylinder aus 4 heptameren Ringen. Die äußeren Ringe werden durch die  $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha$ 1-7 gebildet und die inneren Ringe von den jeweiligen  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1-7. Die Reihenfolge, in der die Untereinheiten angeordnet sind, ist festgelegt (Groll, et al., 1997). Nur die drei  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 1( $\delta$ ),  $\beta$ 2(Z) und  $\beta$ 5(MB1) sind in der Lage, Peptidbindungen zu spalten. Ihre katalytische Aktivität erlangen die aktiven Untereinheiten jeweils durch ein N-terminales Threonin, dessen Aminogruppe für die Peptidase Aktivität als Nukleophil dient (Groll, et al., 1997; Lowe, et al., 1995). Da jede Untereinheit doppelt repräsentiert ist, befinden sich sechs aktive  $\beta$ -Untereinheiten im Proteasom.

Jede der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten besitzt eine unterschiedliche Substratspezifität (Orlowski, 1990; Rivett, 1989). So schneidet  $\beta 1(\delta)$  bevorzugt nach sauren Aminosäuren (peptidyl–glutamyl–spaltende Aktivität),  $\beta 2(Z)$  spaltet bevorzugt nach basischen Aminosäuren (trypsin-ähnliche Aktivität) und die Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren (chymotrypsin-ähnliche Aktivität) wird  $\beta 5(MB1)$  zugeordnet. Im Inneren des Zylinders befindet sich die proteolytische Kammer, in der die aktiven  $\beta$ -Untereinheiten Zugang zu ihrem Substrat bekommen. Die zwei äußeren  $\alpha$ -Ringe verschließen diese Kammer, welche durch eine reversible Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheiten durch die Aktivatoren wieder geöffnet werden kann (Groll, et al., 1997).

Das 20S Proteasom selbst ist wahrscheinlich nicht in der Lage, Proteine zu entfalten und sie abzubauen (Nandi, et al., 1997; Zwickl, et al., 1999). Dazu sind regulatorische Komplexe notwendig, die sich an den jeweiligen Öffnungen an den Polen des Zylinders befinden. Diese Komplexe werden als 19S Regulator bezeichnet und bestehen speziesabhängig aus 18-20 verschiedenen Untereinheiten. Die Untereinheiten formen eine asymmetrische Struktur, die sich aus zwei Subkomplexen zusammensetzt, dem so genannten *Base*-Komplex und dem *Lid*-Komplex (Glickman, et al., 1998). Diese Struktur bindet ubiquitinierte Substrate, entfaltet sie und führt sie den proteolytisch aktiven Untereinheiten zu (Zwickl, et al., 1999). Es wurden bisher drei unterschiedliche regulatorische Komplexe entdeckt: Der schon erwähnte 19S Regulator oder PA700, der 11S Regulator (PA28), der bei der Immunantwort eine Rolle spielt, und PI31, der das Proteasom möglicherweise inhibiert (Dubiel, et al., 1992; Ma, et al., 1993; Tanahashi, et al., 1999; Waxman, et al., 1987; Zaiss, et al., 1999).

## 1.2 Die Biogenese des 20S Proteasoms

Die koordinierte Zusammenlagerung der 28 proteasomalen Untereinheiten ist sehr kompliziert und läuft in mehreren Schritten ab. Die zurzeit existierenden Modelle beruhen auf Untersuchungen des Proteasoms aus Archaeobakterien, Eubakterien, der Hefe, der Maus und aus dem humanen System. Im Gegensatz zum eukaryotischen Proteasom, setzt sich das Proteasom des Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* aus jeweils einem Typ der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammen (Dahlmann, et al., 1989). Die

Assemblierung scheint in Archaeobakterien und Eubakterien einfacher abzulaufen als in Eukaryoten, denn sowohl in *Thermoplasma* als auch in *Rhodococcus* ist eine Assemblierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten *in vitro* möglich, während dies in Eukaryoten nicht der Fall ist (Gerards, et al., 1997; Zuhl, et al., 1997; Zwickl, et al., 1992). In Experimenten mit rekombinantem  $\alpha 7(C8)$  Protein konnte zwar ein Ringkomplex gebildet werden, aber es konnte sich keine proteasomale Struktur durch Koexpression mit  $\beta 7(N3)$  oder  $\beta 1(\delta)$  formen (Gerards, et al., 1997). Es ist daher anzunehmen, dass die eukaryotische Biogenese des 20S Proteasoms, verglichen mit der Assemblierung des Proteasoms bei Prokaryoten, komplizierter ist. Die Biogenese beginnt mit der Synthese proteasomaler Untereinheiten, wobei die meisten  $\beta$ -Untereinheiten mit einer N-terminalen Verlängerung, dem Propeptid, synthetisiert werden. In Mammalia werden fünf der sieben  $\beta$ -Untereinheiten mit Propeptiden exprimiert. Wie in Abb. 2 dargestellt, bildet sich vermutlich als erster Assemblierungsschritt ein heptamerer  $\alpha$ -Ring, der als Matrize für die Anlagerung der  $\beta$ -Untereinheiten dient. Nach einem alternativen Model kommt es erst zu einer Dimerisierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Gerards, et al., 1998; Zuhl, et al., 1997). In *Rhodococcus* unterstützen die Propeptide die Assemblierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Kwon, et al., 2004), was auch bei Eukaryoten zu erwarten ist, da einige Propeptide essentiell für die Reifung des Proteasoms sind (Chen and Hochstrasser, 1996). In Mammalia lagern sich die ersten  $\beta$ -Untereinheiten an den  $\alpha$ -Ring in Form eines so genannten 13S Komplexes an (Frentzel, et al., 1994). Bei diesen „frühen“  $\beta$ -Untereinheiten handelt es sich um  $\beta 2(Z)$ ,  $\beta 3(C10)$  und  $\beta 4(C7)$  (Nandi, et al., 1997). Darauf folgen die  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta 5(MB1)$ ,  $\beta 6(C5)$ ,  $\beta 7(N3)$  und  $\beta 1(\delta)$ . Dieser Komplex wird dann 16S Hemiproteasom genannt. Für die anschließende Reifung des Proteasoms werden die beiden Hemiproteasomen zusammengelagert (Chen and Hochstrasser, 1996). Hierfür sind vermutlich die C-terminalen Bereiche der  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta 7(N3)$ ,  $\beta 1(\delta)$  und  $\beta 2(Z)$  wichtig, indem sie als „molekulare Klammern“ wirken und den Assemblierungs-Komplexe stabilisieren (Ramos, et al., 2004). Für die Dimerisierung der 16S Komplexe ist es notwendig, dass sich das aktive Threonin von seiner geschützten Position innerhalb des *Precursor*-Komplexes in die Position des reifen Proteasoms bewegt (Mullapudi, et al., 2004). In diesem Assemblierungszustand kommt es in einem Zwei-Schritt Mechanismus zu einer autokatalytischen Abspaltung der Propeptide der

aktiven Untereinheiten (Schmidtke, et al., 1996). Die inaktiven  $\beta$ -Untereinheiten werden von den bereits aktivierten Nachbar-Untereinheiten prozessiert (Heinemeyer, et al., 1997; Jager, et al., 1999). Nach den Prozessierungen folgt die Degradation von POMP und die Biogenese des 20S Proteasoms ist abgeschlossen (s. Abb. 1 und Abschnitt 1.2.1).

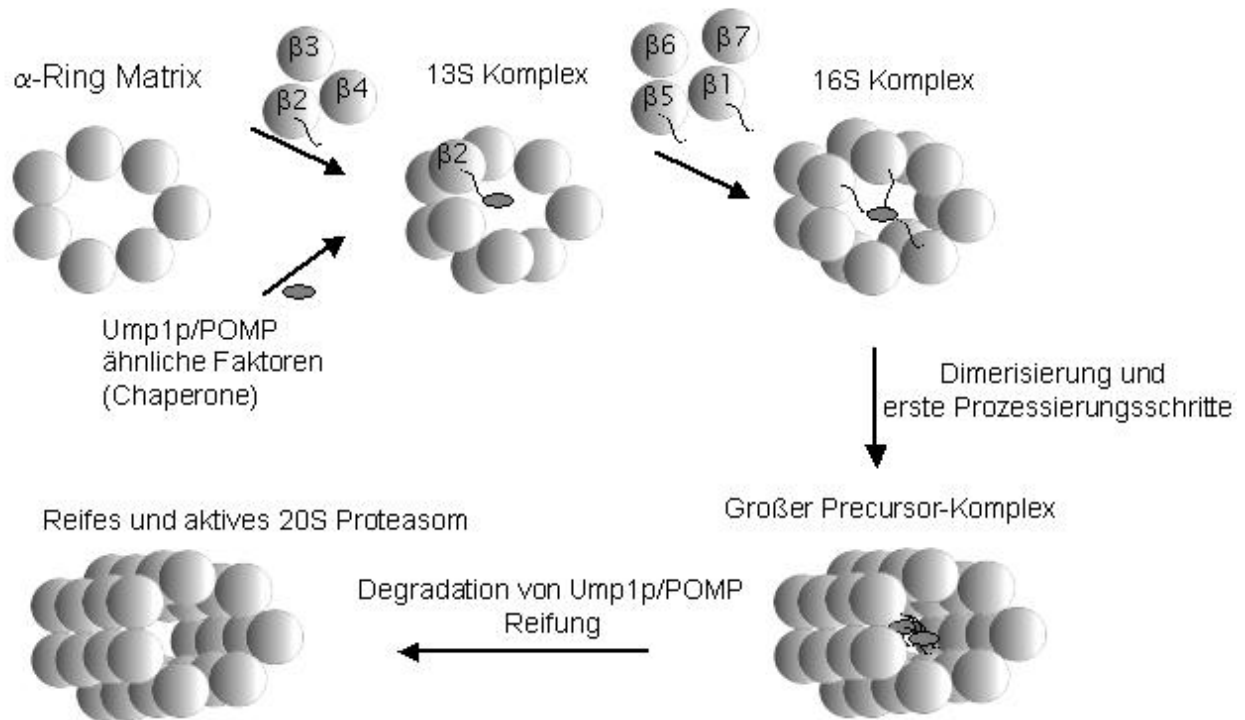


Abb. 2: **Modell der Mammalia 20S Proteasom Biogenese**

Die Biogenese des 20S Proteasoms beginnt nach der Synthese der Untereinheiten vermutlich mit der Bildung einer  $\alpha$ -Ring Matrix an der sich dann die „frühen“  $\beta$ -Untereinheiten in Verbindung mit Assemblierungsproteinen, wie POMP, anlagern. Die Biogenese verläuft weiterhin über die Komplexe 13S und 16S. Die 16S Komplexe dimerisieren und formen so das 20S Proteasom. Detaillierte Beschreibung siehe Text (aus (Kruger, et al., 2003).

### 1.2.1 Helferproteine bei der Proteasombiogenese

Anders als bei der Biogenese des Archaea-Proteasoms sind in der eukaryotischen Proteasom-Biogenese akzessorische Proteine notwendig. So wurde bei Fraktionierung von 16S Precursor Komplexen durch Saccharose-Gradientenzentrifugation das Chaperon

Hsc73 gefunden (Schmidtke, et al., 1997). Man vermutete, dass Hsc73 die Konformation des Hemiproteasoms unterstützt. Ein Jahr später wurde ein weiteres Protein entdeckt, das den Assemblierungsprozess in Eukaryoten unterstützt. Ramos *et al.* identifizierte das Protein Ump1 (*Ubiquitin-mediated proteolysis*) bei einer Hefe-Mutante mit einem Defekt in der Proteolyse (Ramos, et al., 1998). Es besteht aus 148 Aminosäuren und ist mit den *Precursor*-Komplexen des Proteasoms assoziiert. In Hefe bindet Ump1 vermutlich an die Aminosäuresequenz des Propeptids von  $\beta 5$ . Eine Deletion von 5 Aminosäuren im Ump1-Protein verhindert im humanen System seine Assoziation mit dem Vorläufer Proteasom (Burri, et al., 2000; Ramos, et al., 1998). Es wird vermutet, dass Ump1 dort die koordinierte Prozessierung der Propeptide unterstützt und dann zum ersten Substrat des reifen Proteasoms wird (Ramos, et al., 1998). Seitdem wurden mehrere Ump1 homologe Proteine in anderen Organismen gefunden. Ump1 homologe Proteine wurden in Datenbanken für Mensch, Maus, Ratte, *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Kruger, et al., 2001). Daher gibt es seitdem mehrere Bezeichnungen für dieses Protein bei Mammalia. So wurde zum Beispiel POMP (*proteasome maturation protein*) im humanen System gefunden, außerdem wurde Proteasemlin bei der Maus und h/mUMP in murinen und humanen Zellen identifiziert (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). POMP bindet an das Propeptid der Mammalia und Hefe  $\beta$ -Untereinheit  $\beta 5$  (Cagney, et al., 2001; Jayarapu and Griffin, 2004). Diese Bindung scheint entscheidend für die Assemblierung des Proteasoms zu sein, da das  $\beta 5$ -Propeptid essentiell für die Biogenese ist (Jager, et al., 1999). Die Rolle von POMP bei der Biogenese des Immunoproteasoms ist zurzeit noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Jayarapu *et al.* und Macagno *et al.* vermuteten aufgrund von *yeast-two hybrid* Analysen und Expressionsanalysen, dass POMP nicht in die Assemblierung des Immunoproteasoms eingreift (Jayarapu and Griffin, 2004; Macagno, et al., 2001). Im Gegensatz dazu zeigten Witt *et al.* und Griffin *et al.* eine Interaktion mit dem Präimmunoproteasom und eine Interferon  $\gamma$  vermittelte mRNA Induktion (Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000).

### 1.3 Interferon $\gamma$ und die Rolle des 26S Proteasoms für die Immunantwort

Das Proteasom spielt immunologisch eine wichtige Rolle. Unter Interferon  $\gamma$ -Einfluss werden die Schnitteigenschaften des 26S Proteasoms moduliert. Dazu werden die jeweiligen aktiven Untereinheiten  $\beta 1(\delta)$ ,  $\beta 2(Z)$  und  $\beta 5(MB1)$  durch die so genannten Immununtereinheiten  $i\beta 1$  (LMP2),  $i\beta 2$  (MECL-1) und  $i\beta 5$  (LMP7) durch *de novo* Formation ersetzt (Kruger, et al., 2003). Bei dieser Immunoproteasom-Biogenese spielt wahrscheinlich auch das Assemblierungsprotein POMP eine wichtige Rolle, da seine mRNA durch Interferon  $\gamma$  stimulierbar und das Protein mit dem *Precursor* des Immunoproteasoms assoziiert ist (Burri, et al., 2000; Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Die unter anderem durch das Immunoproteasom generierten Peptide werden über das Endoplasmatische Retikulum (ER) an die Zelloberfläche transportiert. Dazu werden die antigenen Peptide über den TAP (*transporter associated with antigen processing*) vom Cytosol in das ER-Lumen transportiert. Im Lumen werden die Peptide auf MHC Klasse I-Moleküle übertragen, der entstandene Komplex wird dann über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche zur Antigen-Präsentation befördert (Kruger, et al., 2003).

Interferone wurden schon 1959 als antivirale Substanzen entdeckt. Isaacs und Lindenmann beobachteten in Zellkultur mit Influenza infizierten Hühnerzellen ein Sekret, welches die virale Infektion verhindern konnte (Isaacs and Lindenmann, 1957). Interferone gehören zur Gruppe der Zytokine, die als Mediatoren bei der koordinierten Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Bei den Interferonen handelt es sich um kurze Glykoproteine, die unter anderem von Leukozyten, Fibroblasten und Lymphozyten gebildet werden können. Man unterteilt die Interferone in zwei Typen: Typ I Interferone, die auch als virale Interferone bezeichnet werden und Typ II oder Immun-Interferone. Zum Typ I gehören Interferon  $\alpha$  und  $\beta$ , während den Typ II nur Interferon  $\gamma$  zuzuordnen ist. Interferone wirken in unterschiedlicher Weise auf ihre Zielzellen ein. So sprechen Interferon Typ I und Typ II verschiedene Rezeptoren an. Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  binden an den Rezeptor IFNAR (*Interferon Alpha Receptor*). Dieser Rezeptor gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und dimerisiert bei Bindung seines Substrates. Über eine Phosphorylierungskaskade werden die Transkriptionsfaktoren der Familie STAT (*signal transdu-*

*cer and activator of transcription*) phosphoryliert und somit aktiviert. Bei Interferon  $\alpha/\beta$  Induktion interagieren STAT1 und STAT2 mit einem Nicht-STAT Protein p48 (IRF-9) und translozieren in den Zellkern, wo sie ihre Zielgene aktivieren. Bei Interferon  $\gamma$  gibt es einen ähnlichen Mechanismus. Nur wird hier der *Interferon Gamma Rezeptor* (IFNGR) angesprochen. Bei Bindung von Interferon  $\gamma$  an den Rezeptor werden die Tyrosin-Kinasen der *Janus-Familie* (JAK) aktiviert, die dann den Transkriptionsfaktor STAT1 phosphorylieren. Daraufhin bildet dieser ein Homodimer und kann in den Kern translozieren und über die Bindesequenzen der DNA die Effektorgene ansprechen. Interferon  $\gamma$  ist auch in der Lage, Genregulation über posttranskriptionelle mRNA-Stabilisierung zu erzielen. Zum Beispiel identifizierten Snyder *et al.* ein *interferon response element* (IRE) in der 3'-UTR des HLA-A2 Gens. IRE-Sequenzen werden gewöhnlich im Zusammenhang mit der Transkriptionskontrolle gefunden (s. Abschnitt 1.3.1). Beim HLA-A2 Gen ist die Sequenz das IRE mit der Stabilisierung der mRNA in Anwesenheit von Interferon  $\gamma$  verknüpft (Snyder, et al., 2001). Weitere Beispiele für diese Art der Regulation durch Interferon  $\gamma$  sind die posttranskriptionelle Regulationen der Gene *nitric-oxide-synthase* (NOS) und des *ClC-2 Chlorid-Kanal*-Gens (Chesler, et al., 2004; Chu, et al., 2004).

### 1.3.1 Interferon $\gamma$ *cis-acting* DNA-Elemente

Die bekanntesten Zielsequenzen der Interferon vermittelten STAT-Transkriptionsfaktoren sind ISRE (*Interferon stimulated response element*) für Typ I Interferone, während GAS (*gamma-activated sequence*) von Interferon Typ II aktivierten Transkriptionsfaktoren angesprochen werden. Bei einer Reihe von STAT Proteinen wurde eine Bindung an GAS-ähnliche Sequenzen beschrieben (Bach, et al., 1997). Es werden weiterhin immer neue *cis-acting*-Elemente, die auf Interferon  $\gamma$  ansprechen, identifiziert. So wurde 2002 das GAIT-Element (*gamma-IFN-activated transcriptional element*) und ein neuer Faktor, der Transkriptionsfaktor GBF (*GAIT binding factor*), identifiziert (Hu, et al., 2002). Es gibt Beispiele in denen auch *cis-acting* Elemente im 3'-UTR Bereich von Genen entdeckt wurden. So konnte innerhalb der Sequenz eines Glycoproteingens ein solches Element gefunden werden. Unter Interferon  $\gamma$ -Einfluss bindet die *glutamyl-*



*prolyl-tRNA synthetase* (GluProRS) an eines dieser Elemente und inhibiert dadurch die Translation (Sampath, et al., 2003; Sampath, et al., 2004). In der Signaltransduktions-Kaskade sind einige zusätzliche Proteine beschrieben worden, die von dem Interferon  $\gamma$ -Signalweg aktiviert werden. Unter anderem werden die MAP-Kinasen (*Mitogen-activated protein kinase*) Pyk2, ERK 1 / 2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1 / 2*), das G-Protein gekoppelte Signalmolekül C3G und Rap-1 (*RAS GTPase-activating protein 1*) durch Interferon  $\gamma$  aktiviert (Ramana, et al., 2002). Diese Aktivierung von Kinasen kann die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Folge haben. Für die induzierenden STAT1 Homodimeren gibt es noch zahlreiche Co-Aktivatoren, welche die Transkription vieler Gene beeinflussen, wie z.B. das *CREB-binding protein* (CBP / p300) (Ramana, et al., 2002).

Weitere Beispiele für eine transkriptionelle Regulation durch Interferon  $\gamma$  liefern die Immununtereinheiten des Proteasoms. Bisher ist nur von zwei Immununtereinheiten bekannt, wie die Interferon  $\gamma$  Antwort gesteuert wird. Die proteasomalen Gene PSMB9 - (LMP2) und PSMB10 (MECL-1) werden unter Einfluss von Interferon  $\gamma$  und der STAT-Signalkaskade transkriptionell induziert (Barton, et al., 2002). Der Promotor von PSMB9 (LMP2) wird durch ein GAS-Element kontrolliert (Barton, et al., 2002; Brucet, et al., 2004), während der PSMB10 (MECL-1) Promotor über IRE durch Interferon  $\gamma$  angesprochen wird (Foss and Prydz, 1999; Hayashi, et al., 1997). Für das Assemblierungsprotein POMP gibt es noch keine Hinweise auf die Regulation durch Interferon  $\gamma$ .

## 1.4 Proteasom-Inhibitoren

Die Inhibition von Enzymen ist ein wirkungsvoller Mechanismus, um komplexe Zusammenhänge in der Zelle zu verstehen. Für das Proteasom gibt es mittlerweile eine ganze Reihe von inhibitorischen Substanzen. Proteasom-Inhibitoren unterteilt man in zwei Gruppen, die synthetischen Analoga und die Naturprodukte (s. Tab. 1).

Tab. 1: **Proteasom-Inhibitoren**  
Gruppenaufteilung und deren Mitglieder

| <b>Synthetische</b>            |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>Substrat-Analoga</b>        | <b>Naturprodukte</b>            |
| Peptid-Aldehyde                | Epoxyketone                     |
| Peptid-Vinyl-Sulfone           | Peptid-Macrocycles              |
| Peptid-Benzamine               | $\gamma$ -Lactam-Thiol-Ester    |
| Peptid- $\alpha$ -Ketoamide    | Epipolythiodioxopiperazin Toxin |
| <b><u>Peptid-Borsäuren</u></b> |                                 |
| Peptid- $\alpha$ -Ketoaldehyde |                                 |

---

Zu den bekanntesten und weit verbreiteten synthetischen Analoga gehören die Peptid-Aldehyde. Sie werden schon länger als Inhibitoren für Serin- und Cystein- Proteasen verwendet. Der Mechanismus der Inhibition durch Peptid-Aldehyde beruht auf Hemiacetal-Bildung mit dem Threonin 1 der katalytischen Untereinheiten. Diese Bindung ist unter physiologischen Bedingungen reversibel. Zu den Peptid-Aldehyden gehört auch das in dieser Arbeit verwendete MG132 (Rock, et al., 1994). Die Gruppe der Peptid-Aldehyd-Inhibitoren zeichnet sich durch die reversible Bindung an das aktive Zentrum und die Inhibition der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms aus. Außerdem besitzen alle Peptid-Aldehyde eine hervorragende Zellpermeabilität, die durch das Lösungsmittel DMSO unterstützt wird. Weitere Mitglieder der synthetischen Analoga sind die Vinyl-Sulfonate. Sie sind bekannt für eine Inaktivierung ihres Substrates durch Wasserstoffbrückenbindung am aktivem Zentrum. Sie können das 20S Proteasom inhibieren, indem sie eine irreversible Modifikation des katalytischen Threonins verursachen (Bogyo, et al., 1997; Glas, et al., 1998). Eine andere Gruppe der Peptid basierten Inhibitoren hat **Borsäure** als reaktive Gruppe. Sie werden Peptid-**Borsäure** Inhibitoren ge-

nannt und sind wasserlöslich. Die Inaktivierung des Proteasoms verläuft anders als bei den vorangegangenen Inhibitoren über eine nicht-kovalente Komplex-Bildung. Der Mechanismus der Inhibition beruht auf eine „pseudo-kovalente“ Bindung zwischen dem Bohr-Atom und dem Sauerstoffatom des proteasomalen Threonin 1. Die am besten charakterisierte Substanz aus dieser Klasse ist Dipeptid-Borsäure PS-341 (Adams, et al., 1998). PS-34, auch bekannt unter dem Namen Bortezomib, ist als potenter Inhibitor in der Krebstherapie zugelassen (An, et al., 2004; Durrant, et al., 2004; Kondagunta, et al., 2004; Shah, et al., 2004).

Inhibitoren aus der Klasse der Naturprodukte wurden in verschiedenen Organismen entdeckt. Zum Beispiel ist Lactacystin ein Metabolit aus *Streptomyces lactacystinaeus* und ist ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft die Neuronendifferenzierung zu beeinflussen aufgefallen (Omura, et al., 1991; Omura, et al., 1991). Später konnte Lactacystin noch eine Rolle bei der Inhibition des Zellzyklus zugeordnet werden (Fenteany, et al., 1994). 1995 konnte gezeigt werden, dass Lactacystin irreversibel an die aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms bindet (Fenteany, et al., 1995). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte 1996 durch Dick *et al.* aufgeklärt werden (Dick, et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass sich Lactacystin unter physiologischen Bedingungen in die stabile Form *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -lacton umwandelt und mit den Hydroxygruppen des Threonins der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten reagiert. Die Inhibition des Proteasoms ist hoch spezifisch, auch wenn es einige Berichte über eine Einwirkung auf andere zelluläre Proteasen gibt (Ostrowska, et al., 1997). In Actinomyceten wurde der Proteasom-Inhibitor Epoxomicin entdeckt (Hanada, et al., 1992). Epoxomicin ist ein Mitglied einer Familie von linearen Peptiden. 1999 konnte die spezifische Inhibition des 20S Proteasoms durch dieses Naturprodukt gezeigt werden (Meng, et al., 1999). Die Spezifität von Epoxomicin wurde durch Ko-Kristallisation des Epoxomicin mit dem 20S Proteasoms aus der Hefe aufgeklärt (Groll, et al., 2002).

## **1.5 Regulation von proteasomalen Genen in Mammalia und Homologe in Hefe und Bakterien**

In Gram-positiven Bakterien existieren Proteasen (ClpCP), die den  $\beta$ -Untereinheiten

des eukaryotischen Proteasoms homolog sind. Sie sind wie das 26S Proteasom, ATP-abhängig und bestehen aus zwei hexameren Ringen (Bochtler, et al., 1997). Die ClpCP-Operons befinden sich unter Kontrolle eines Repressors (CtsR), der von McsA, einem Zink-Finger-Protein, unter Normalbedingungen stabilisiert wird. Unter Stressbedingungen wird der Repressor durch ClpCP und mit Hilfe der putativen Kinase McsB degradiert, was zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus führt (Kruger, et al., 2001). Ein anderes Beispiel für einen solchen Rückkopplungsmechanismus wurde in *E. coli* für den  $\sigma^{32}$ -Faktor entdeckt (Gottesman, 1996).

Über die eukaryotische Genkontrolle des Proteasoms ist nur wenig bekannt. Bei niederen Eukaryoten, wie in *Saccharomyces cerevisiae*, werden 26 der 32 Gene der proteasomalen Untereinheiten durch ein 5' *cis-acting* Element reguliert (Mannhaupt, et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor Rpn4 bindet an das so genannte PACE-Element (*Proteasome-associated control element*) und aktiviert die Transkription (Mannhaupt, et al., 1999). Rpn4 ist nicht nur ein allgemeiner Transkriptionsfaktor, sondern ist auch Substrat des Proteasoms und ermöglicht somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus für die Kontrolle der proteasomalen Homöostase in der Zelle (Ju, et al., 2004; Xie and Varshavsky, 2001). Die Degradation durch das Proteasom kann durch zwei unterschiedliche Signalwege vermittelt werden. Es wurde gezeigt, dass Rpn4 ubiquitiniert und nicht-ubiquitiniert degradiert werden kann (Ju and Xie, 2004; Wang, et al., 2004).

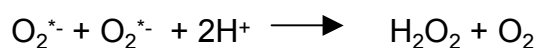
Hinweise auf einen ähnlichen Mechanismus der Regulation wurden in *Drosophila* gefunden. Mittels RNA Interference (RNAi) wurde gezielt die Menge an Transkript einzelner proteasomaler Untereinheiten reduziert. Die Zellen reagierten mit einer gesteigerten Expression der proteasomalen Untereinheiten, die nicht Ziel von RNAi waren (Wojcik and DeMartino, 2002). In *Drosophila* wurden *cis-acting* Elemente in einigen 5'DNA-Sequenzen von proteasomalen Genen identifiziert, die eine gemeinsame Regulation der verschiedenen Gene vermuten lassen können (Masson, et al., 2003). Jedoch konnte nur in 6 der 14 proteasomalen Untereinheiten eine solche Sequenz gefunden werden. In Mammalia gibt es ebenfalls Hinweise auf eine solche Regulation proteasomaler Gene. Dort wurde im Zusammenhang mit Muskelatrophie eine Hochregulation von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems beobachtet, so dass man auch für Mammalia eine solche Form der Regulation erwarten kann (Price, 2003). Es gibt meh-

rere Berichte, dass Komponenten des 19S Regulators in Mechanismen der Transkription eingreifen. Für Rpt6 und Rpt4, zwei ATPase-Untereinheiten des 19S Regulators, konnte eine Interaktion mit Promotorelementen nachgewiesen werden (Chang, et al., 2001; Makino, et al., 1999). Allerdings konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem 19S Komplex und der Regulation proteasomaler Gene hergestellt werden. Es ist zurzeit weder nachgewiesen, ob es eine gemeinsame Regulation proteasomaler Gene gibt, noch ob die proteasomalen Untereinheiten einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor ähnlich wie in Hefe besitzen.

## 1.6 Oxidativer Stress

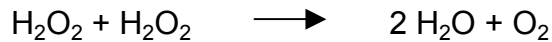
Oxidativer Stress entsteht hauptsächlich durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zu den ROS werden einerseits Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ) oder das Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ) gezählt. Andererseits gehören zu dieser Substanzgruppe auch Nichtradikale wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die aufgrund ihrer oxidierenden Wirkung eine Radikalbildung begünstigen. ROS werden unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des oxidativen Metabolismus freigesetzt. In den Mitochondrien werden in der Atmungskette die meisten Radikale gebildet (McCord, 2000). Die freigesetzten Radikale verursachen kovalente Modifikationen von Makromolekülen, führen zu Gewebsschädigungen und Mutationen der DNA. Um diesen enormen Zellschäden entgegenzuwirken, haben die Organismen verschiedene Schutzmechanismen entwickelt. Dazu gehören zum Beispiel die Antioxidantien. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zu der ersten Gruppe gehören Metabolite und Vitamine, die aufgenommen oder synthetisiert werden. Dazu gehören Vitamin A, C und E, weiterhin NAD(P)H / NAD(P), Harnsäure und die Ionen  $Mg^{2+}$  oder  $Cu^{2+}$  (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman, 1990). Zur zweiten Gruppe gehören Proteine und Enzyme. Hierzu gehören Katalase (KAT), Glutathion-Peroxidase (GPx), Superoxiddismutase (SOD) und andere Peroxidasen (Berlett and Stadtman, 1997). Die Enzymreaktionen sind im Folgenden zusammengefasst:

Superoxiddismutase (SOD):

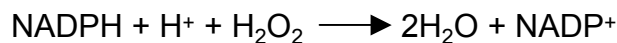


Durch diese Reaktion wird das Sauerstoffradikal unschädlich gemacht und das Produkt in der nachfolgenden Reaktion zu H<sub>2</sub>O umgesetzt.

Katalase (KAT):



Glutathion-Peroxidase (GPx):



Diese Reaktionen werden durch die so genannten Phase II Enzyme katalysiert, die nach Freisetzung von ROS gemeinsam aktiviert werden.

Genomische Analysen der induzierbaren Gene weisen ein gemeinsames *cis-actin* DNA-Element auf, welches *antioxidant response element* (ARE) genannt wird (Rushmore, et al., 1990; Rushmore, et al., 1991). Dieses Element wurde weiterhin in verschiedenen Genen von DNA-Reparatur- oder Stress-Proteinen gefunden sowie auch bei dem Proteasom (Talalay, et al., 2003). Die transkriptionelle Regulation dieser Gene wird über den Transkriptionsfaktor *NF-E2-related factor 2* (Nrf2) reguliert (Itoh, et al., 1997). Dieser Faktor bindet am Cytoskelett durch das Protein *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) (Itoh, et al., 1999). Keap1 agiert als Sensor für die ROS durch einen Cystein-Rest, der nach oxidativem Stress posttranslational modifiziert wird (Dinkova-Kostova, et al., 2002; Zhang and Hannink, 2003). Die Modifikation bewirkt eine Freisetzung von Nrf2. Keap1 führt Nrf2 im inaktivem Zustand einer Ubiquitin-abhängigen Degradation durch das Proteasom zu (Zhang and Hannink, 2003). Nrf2 wird im Normalzustand relativ schnell durch das Proteasom abgebaut. Es besitzt eine Halbwertszeit von nur 10 bis 30 Minuten (Nguyen, et al., 2003). In Zellen, die unter oxidativem Stress stehen, wird Nrf2 von Keap1 befreit und durch den Repressor iNrf2 stabilisiert (Sekhar, et al., 2002). So kann Nrf2 in den Kern transloziert werden. Dieser Mechanismus wird durch andere Faktoren unterstützt, die Nrf2 aktivieren können. Huang *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Nrf2 durch die Protein-Kinase C (PKC) phosphoryliert wird und sich so von Keap1 lösen kann (Huang, et al., 2000; Huang, et al., 2002). Es wird diskutiert, dass mehrere Signale zusätzlich diesen Weg beeinflussen können. So gibt es mehrere Berichte, dass der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Signalweg in die Nrf2-

Aktivierung eingreift (Kang, et al., 2002; Lee, et al., 2001). Es werden außerdem noch drei weitere Kinasen mit der Aktivierung von Nrf2 in Verbindung gebracht: *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK; (Elbirt, et al., 1998; Otterbein, et al., 2000), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK; (Numazawa and Yoshida, 2004) und *c-jun N-terminal kinase* (JNK; (Oguro, et al., 1998).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Eine Interferon  $\gamma$ -Behandlung hat zahlreiche Auswirkungen auf eine Zelle. Zum Beispiel wird das so genannte Immunoproteasom über *de novo* Formation gebildet. Es besitzt im Vergleich zu dem konstitutiven Proteasom modifizierte Schnitteigenschaften. Vermutlich wird diese Neubildung des Immunoproteasoms auch durch das an der Biogenese des konstitutiven Proteasoms beteiligten *Proteasome maturation protein* (POMP) unterstützt. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die mRNA von POMP nach Interferon  $\gamma$ -Stimulation induziert wird. Bekannt ist, dass die mRNA-Menge von POMP unter Interferon  $\gamma$  Einwirkung zunimmt. Die Ursache für diesen Effekt ist bis heute allerdings noch nicht aufgeklärt. Es ist zu vermuten, dass die Induktion von POMP ähnlich der der Immununtereinheiten gesteuert wird. Diese werden transkriptionell über STAT Transkriptionsfaktoren reguliert (Barton, et al., 2002; Brucet, et al., 2004; Foss and Prydz, 1999; Hayashi, et al., 1997). Um diese offene Fragestellung zu untersuchen, sollte der bisher noch unbekannte Promotorbereich des POMP-Gens zunächst durch Reporter-gen-Analysen eingegrenzt werden. Der so ermittelte Promotor sollte dann im Hinblick auf die Interferon  $\gamma$ -Antwort charakterisiert werden. Für den Fall, dass die Induktion nicht transkriptionell gesteuert wird, sollte untersucht werden, ob ein posttranskriptioneller Einfluss die Ursache hierfür sein kann.

ATP-abhängige Proteasesysteme in Bakterien und Hefen sind streng reguliert. In einigen Bakterien erfüllen die Clp-Proteasen die Funktionen des eukaryotischen Proteasom-Systems. In Hefe ist ein transkriptioneller Aktivator für proteasomale Untereinheiten beschrieben (Xie and Varshavsky, 2001). RPN4 bindet an eine 5' regulatorische Sequenz (PACE) und wird durch das Proteasom abgebaut (Mannhaupt, et al., 1999). Auch in *Drosophila* deutet sich eine Regulation proteasomaler Untereinheiten auf

Transkriptionsebene an. Ein *knock-down* proteasomaler Untereinheiten durch RNA Interference in *Drosophila* führt zu einer Kompensation durch Induktion der Untereinheiten, die nicht Ziel der RNAi waren (Wojcik and DeMartino, 2001). Für Säugerzellen gab es Hinweise zur Regulation des Proteasoms bei verschiedenen Krankheiten (Du, et al., 2000; Price, et al., 1996).

Diese Beispiele deuten auf eine Regulation der Synthese des Proteasoms hin, da jede Zelle bei unterschiedlichen Bedingungen verschiedene Mengen des Proteasoms benötigt. Kürzlich konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Meiners *et al.* ein Zusammenhang zwischen der Inhibition des Proteasoms und daraus resultierender transkriptioneller Hochregulation von proteasomalen Untereinheiten festgestellt werden. Denkbar ist, dass durch die Inhibition des Proteasoms der Abbau eines regulatorischen Proteins blockiert wurde. Dieses würde einen autoregulatorischen *Feedback*-Mechanismus in Gang setzten. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Effekt eingehender untersucht werden. Da die Art der Induktion nicht bekannt war, sollte zuerst geprüft werden, ob die Induktion auf transkriptioneller Ebene auch auf translationaler Ebene nachweisbar ist. Die Fragestellung, die sich daran anschloss war, ob eine Expression der proteasomalen Untereinheiten ausreicht, um den kompletten Biogeneseweg zu forcieren. Falls die Induktion der proteasomalen Gene transkriptioneller Natur sein sollte, wäre zu testen, ob ein Transkriptionsfaktor zu finden ist. Dazu sollte exemplarisch der Promotor einer Untereinheit des Proteasoms untersucht werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Oligonukleotide

| Oligonukleotid name | SEQUENZ (5' - 3')                           | Beschreibung   |
|---------------------|---|--|
| RACEUMP-F           | GGGTCGACTGACGGTAACGGG                       | für Amplifikation POMP-L mRNA                            |
| RACEUMP-R           | TCCAATTTGAGAGTTGCCCACTG                     | für Amplifikation POMP-L mRNA                            |
| UMP-F               | GATGGTGGAAATATAAACT TGG                     | für Amplif. Sonde POMP für Northern Hybridisierung       |
| UMP-Probe-R         | TAATACGACTCACTATAGGGTGT<br>CAGTACTTTTAATGTG | für Amplif. Sonde POMP für Northern Hybridisierung       |
| PPP1                | CGCGGATCCGGCTGGTCTTGAACCTCCT<br>GA          | 4 kb POMP Promotor, 5' Primer                            |
| PPP5                | TGTCCCTCCAACCTCATCTC                        | 2,2 kb POMP Promotor, 5' Primer                          |
| PPP6bSac            | CGAGCTCGCAATTCAAAGGGCCCAACA                 | 0,7 kb POMP Promotor, 5' Primer;<br>5' Sac-Schnittstelle |
| PPP8                | CTCTGCGAACAGCCTCTCTG                        | Ampl. 2,2 kb POMP Promotor 3' Primer                     |
| PI1-F               | CAGAGAGGCTGTTTCGCAGAG                       | Ampl. POMP Intron 1; 5' Primer                           |
| PI1-R               | CAAAAGGTCCACTTGCTGAA                        | Ampl. POMP Intron 1 3' Primer                            |
| PI1-2kbF            | GGAATTCCCATCATAAGTCAAGGAGCA                 | Intron 1 Fragmentierung, 5'                              |
| PI1-2kbR            | GGAATTCGGTACTTCCTAATAAATCC                  | Intron 1 Fragmentierung, 3'                              |
| .2051               | TCCAGAAGGGAAGAGATTTGTC                      | MECL1-Promotor; 5' (Foss and Prydz, 1999)                |
| 2334rev             | GCAGAGGGGATTAGGGGTC                         | MECL1-Promotor; 3' (Foss and Prydz, 1999)                |
| PPP-1R              | TCGACCCCGCCGCTCACTTC                        | POMP Promotor ohne Teile der 5'-UTR                      |
| PPP-210R            | GAGGGAAGACACGGACTCCG                        | POMP Promotor ohne ersten 210 Basen                      |
| PP3UTRXba-F         | GCTCTAGATAGTGTGCTGTTTCATGGAA<br>AC          | POMP 3'-UTR; 5' Primer ; 5'- XbaI –<br>Schnittstelle     |
| PP3UTRXba-R         | GCTCTAGAAAAATGTAAATTTTATATAT<br>CAAC        | POMP 3'-UTR; 3' Primer; 5'- XbaI –<br>Schnittstelle      |
| PdPXho-R            | CCGCTCGAGTCTTTCCTCCGGTACT<br>GC             | $\beta$ 1( $\delta$ )-Promoter, 3' Primer                |

---

## MATERIAL UND METHODEN

|              |  |  |
|--------------|--|--|
| PdPBam-0.63F | CGCGGATCCCACTTTAGCCCAAAGACTCT                      | 0,6 kb $\beta 1(\delta)$ -Promoter, 5' Primer  |
| PdPBam-1.5F  | CGCGGATCCCCAGTATAAAAAGACAAATAG                     | 1,5 kb $\beta 1(\delta)$ -Promoter, 5' Primer  |
| PP-UTR-Luc F | GGATGGATGGCTACATTCTG                               | Kontrolle 3'-UTR; <i>forward</i> ; Position 1530 auf pGL3control (im Luciferase Gen) |
| PP-UTR-Luc R | TATAATCCTAAAATAGCACT                               | Kontrolle 3'-UTR; 3' ; Position 951 Ac.Nr. BC003390 POMP 3'-UTR                      |
| Pdp100-Sac-F | GAGCTCGAGTAGCTTCGCTCCCAGAA                         | 100 Basen $\beta 1(\delta)$ -Promoter; <i>forward</i> ; 5' SacI-Schnittstelle        |
| Pdp40-Sac-F  | CTTTACGACAGTTGCTTTGAGGCAGTACCGGAGGAGAAAGAC         | Oligo, zum Annealing mit pdp40-Xho-R   |
| Pdp40-Xho-R  | TCGAGTCTTTCTCCTCCGGTACTGCCTCAAAGCAACTGTCGTAAAGAGCT | Oligo, zum Annealing mit pdp40-Sac-F   |
| Oligo dT     | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT                               | RT-PCR   |

### 2.1.1.1 Oligonukleotide für EMSA

| Oligonukleotidname | SEQUENZ (5' - 3')          | Beschreibung   |
|--------------------|----------------------------|--|
| PdpARE-CY5-F       | AAAGAGCGTGACAGAGCGCTTTACGA | 5' Cy5 markiert; $\beta 1(\delta)$ -ARE Sequenz  |
| PdpARE-R           | TCGTAAAGCGCTCTGTACGCTCTTT  | <i>Antisense</i> Strang von $\beta 1(\delta)$ -ARE Sequenz                                 |
| TFIID-CY5-F        | GGGCAGGGTATAACTCACCTGA     | 5' Cy5 markiertes Oligo; positiv Kontrolle; TATA-Binding-Protein; <i>sense</i> Strang      |
| TFIID-R            | TCAGGTGAGTTATACCCTGCCC     | positiv Kontrolle; TATA-Binding-Protein; <i>antisense</i> Strang                           |
| pdpHSE-F           | ACTTTTCTTTTCCCTTCTGC       | 5' Cy5 markiert; $\beta 1(\delta)$ -Hitze Schock Element; <i>sense</i> Oligo               |
| pdpHSE-R           | GCAGAAGGGAAAAGAAAAGT       | 5' Cy5 markiert; $\beta 1(\delta)$ -Hitze Schock Element; <i>antisense</i> Oligo           |
| Comp_pdpHSE-F      | ACTTTTCTTTTCCCTTCTGC       | unmarkiertes Kompetitions Oligo; $\beta 1(\delta)$ -Hitze Schock Element; <i>sense</i>     |
| Comp_pdpHSE-R      | GCAGAAGGGAAAAGAAAAGT       | unmarkiertes Kompetitions Oligo; $\beta 1(\delta)$ -Hitze Schock Element; <i>antisense</i> |
| Comp_pdpARE-F      | AAAGAGCGTGACAGAGCGCTTTACGA | unmarkiertes Kompetitions Oligo; $\beta 1(\delta)$ -ARE; <i>sense</i>                      |
| Comp_pdpARE-R      | TCGTAAAGCGCTCTGTACGCTCTTT  | unmarkiertes Kompetitions Oligo; $\beta 1(\delta)$ -ARE; <i>antisense</i>                  |

## 2.1.2 Geräte

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Agarosegelkammer                          | Renner                       |
| Eismaschine AF-10                         | Scotsman                     |
| Elektrophorese Einheit                    | Hoefer Pharmacia             |
| Feinwaage MC1                             | Sartorius                    |
| Gefrierschrank –20° C                     | Liebherr / puffer<br>hubbard |
| Gefrierschrank –70° C                     | Liebherr / puffer<br>hubbard |
| Tischzentrifuge                           | Heraeus                      |
| Geltrockner Drystar                       | Hölzel                       |
| Heizblock                                 | Eppendorf                    |
| Kühlzentrifuge Avanti J-25                | Beckmann                     |
| Kühlzentrifuge RC24                       | Beckmann                     |
| Kühlzentrifuge 54178                      | Eppendorf                    |
| Leuchtkasten                              | Rex                          |
| Magnetrührer MR 3001 K                    | Heidolph                     |
| Mikrowelle                                | Bosch                        |
| Minigel System                            | Hoefer Pharmacia             |
| Netzgerät DC PS3000                       | Hoefer                       |
| PCR Maschine UNO Block                    | Biorad                       |
| Photometer UV 2102                        | Shimadzu                     |
| Pipetten                                  | Gilson                       |
| Rad/Motor Torque                          | Cole-Parmer<br>Instituts     |
| Röntgenfilmentwickler Hyperpro-<br>cessor | Amersham                     |
| Rotor SS34                                | Sorvall                      |
| Rotor SW 40                               | Beckmann                     |
| Schüttler                                 | Infors                       |
| Semi-Dry Blotkammer                       | PQLAB                        |
| Steril gard Hood classII A1 B3            | Baker                        |
| Stickstofftank                            | Taylor-Wharton               |
| Ultrazentrifuge Ultra Pro 80              | Sorvall                      |

---

## MATERIAL UND METHODEN

---

|                      |            |
|----------------------|------------|
| UV-Tisch             | Appligen   |
| Vakuumtrockner       | Labcono    |
| Vortexer VF2         | Janke&Kune |
| Waage BP210OS        | Sartorius  |
| Wasserbad TWB 12     | Julabo     |
| Zellkultur-Inkubator | Heraeus    |

---

### 2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

|   |           |
|---|-----------|
| 3 MM Papier                               | Whatman   |
| Acrylamid 30 % 29:1                       | AppliChem |
| Bacto-Agar                                | DIFCO     |
| Bacto-Trypton                             | DIFCO     |
| BSA, 100 x                                | NEB       |
| Hefe-Extrakt                              | DIFCO     |
| DMSO                                      | Fluka     |
| Interferon $\gamma$ rekombinant,<br>human | Roche     |

---

### 2.1.4 Kits

|   |            |
|---|------------|
| Midi Plasmidkit                             | Qiagen     |
| Qiaprep Spin                                | Qiagen     |
| <i>GFX-PCR and Gel<br/>purification Kit</i> | Amersham   |
| TA Kloning Kit                              | Invitrogen |
| CAT ELISA                                   | Roche      |

---

### 2.1.5 Verwendete Antikörper

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| Rpt1 (S7) (1:1000)              | polyklonal; WB             |
| $\alpha$ 6 (C2) (1 :1000)       | monoklonal; WB             |
| $\beta$ 1 ( $\delta$ ) (1:2000) | polyklonal; WB             |
| Hsp70 (1:1000)                  | polyklonal; WB; Santa Cruz |

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Ubiquitin                      | WB; Daco                                  |
| K08 ; Gesamtproteasom          | polyklonal; IP; Dr. Kuckelkorn            |
| C8 (1:2000)                    | polyklonal; WB; IP; (Nandi, et al., 1997) |
| MP3 66024                      | polyklonal; WB; (Frentzel, et al., 1993)  |
| POMP (Krü1, gereinigt) (1:750) | polyklonal; WB; IP; Dr. Krüger            |
| Nrf2 (H-300) sc-13032 (1:1000) | polyklonal; WB; Santa Cruz                |
| HSTF1 (H-311) sc-9144          | polyklonal; WB; Santa Cruz                |

---

## 2.1.6 Vektoren

---

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| pGL3control | Promega; Luciferase Kontroll Vektor |
| pGL2basic   | Promega; Luciferase Vektor          |
| pCAT3basic  | Promega; CAT Vektor                 |
| pXP-2       | D. Zaiss; Luciferase Vektor         |
| pCR2.1      | Invitrogen; TA Kloning              |

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Klonierungsmethoden

##### 2.2.1.1.1 Restriktion von DNA

0,5 µg bis 5 µg DNA wurden gemäß Herstellerinformation für 1h bis 3h verdaut.

##### 2.2.1.1.2 Präparation von Klonierungsvektoren

Zur Vorbereitung einer Ligation wurde der jeweilige Vektor mit dem der Klonierungsstrategie entsprechenden Enzym verdaut. Bei einer Restriktion mit nur einem Enzym wurde eine Dephosphorylierung mit Shrimp Phosphatase von Roche gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung der Klonierungsvektoren erfolgt mittels Auftrennung durch ein 1% Agarosegel. Das aufgetrennte Fragment wurde anschließend

durch ein *GFX-PCR and Gel purification Kit* gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und in destilliertem Wasser aufgenommen.

#### **2.2.1.2 Dephosphorylierung von kompatiblen Enden**

Bei Vektoren mit kompatiblen Enden müssen die Enden dephosphoryliert werden, um eine Religation zu vermeiden. Im Falle von DNA hydrolysiert die Shrimp alkalische Phosphatase (AP) das 5' Phosphat Ende. Je 1 Unit Shrimp AP wurde gemäß Herstellerangaben zwei mal 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 65° C Inaktiviert.

#### **2.2.1.3 Ligation**

Für die Ligationsansätze wurden zwischen 10 und 100 ng aufgereinigtem Vektor eingesetzt. Die Konzentration an aufgereinigten Inserts betrug in Bezug auf das molare Verhältnis das 2 – 3 Fache der eingesetzten Vektormenge. Der Ligationsansatz wurde mit 400 U T4 Ligase (New England Biolabs) in einem 20 µl Ansatz für 10 Minuten – 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### **2.2.1.4 Transformation von Bakterienzellen**

Kompetente DH5α wurden nach (Sambrook, et al., 1989) transformiert. Pro Ligationsansatz wurde ein Aliquot kompetente Zellen aufgetaut und 20 bis 50 ng DNA aus dem Ligationsansatz unter die Zellen gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Ansatz einem Hitzeschock ausgesetzt (90 Sekunden bei 42° C) und anschließend 1 Minute auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 700 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37° C mit 1200 rpm geschüttelt. Jetzt wurden die Zellen bei 2500 rpm in der Heraeus Zentrifuge sedimentiert, in ein Gesamtvolumen von 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und ü.N. bei 37° C inkubiert.

### 2.2.1.5 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen (vom DH5 $\alpha$ -Typ)

- TFbI Puffer: 30 mM KOAc; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 15 % Glycerol, mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen; Sterilfiltrieren
- TFbII Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 10 mM RbCl; 15 % Glycerol; mit KOH auf pH 6,5 einstellen; Sterilfiltrieren
- $\phi$ a-Medium: 0,5 % *Bacto Yeast Extract*; 2 % *Bacto Tryptone*; 41 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; mit KOH auf pH 7,6 einstellen; Autoklavieren

100 ml  $\phi$ a-Medium wurden mit 2 ml einer 3 ml Vorkultur angeimpft und bei 37° C bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 mit ca. 200 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde mit 3000 rpm in einer Tischzentrifuge bei 4° C pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 40 ml TFbI Puffer auf Eis resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml TFbII Puffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch aliquotiert (je 100  $\mu$ l) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -70° C gelagert.

### 2.2.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

#### 2.2.2.1 Kochpräparation

- STET-Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 50 mM EDTA; 8 % (w / v) Saccharose; 5 % (v / v) Triton X-100

1,5 ml einer ü.N. Kultur rekombinanter Bakterien wurden 5 Minuten bei 14.000 rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in STET Aufschlußpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde 1 Minute bei 100°C gekocht. Nach einer erneuten Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, folgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Heraeus Tischzentrifuge für 15 Minuten. Das Pellet wurde mit einem geeigneten Gegenstand entfernt und der Überstand mit 200  $\mu$ l Isopropanol versetzt und gut gemischt. Der Ansatz wird für 5 Minuten bei -20 °C vorinkubiert und anschließend wird die DNA bei 4 °C und 14.000 rpm 10 Minuten präzipitiert. Das Pellet wird mit 400  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in einem Vakuumtrockner (Labcono) getrocknet und in 50  $\mu$ l destillierten Wasser

aufgenommen.

### **2.2.2.2 Miniprep (Qiagen)**

Mini Präparation von Plasmid DNA erfolgt mittels Plasmid Mini Kit (Qiaprep Spin Miniprep Kit) gemäß Herstellerangaben.

### **2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese**

- TAE Puffer:
- 6x Probenpuffer:
- 0,7 – 2 % Agarosegele in 1 x TAE und Ethidiumbromid (25 µg/ml)

Für die Auftrennung von DNA nach Molekulargewicht wurden 0,7 – 2 % Agarosegele verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einer Kammer der Firma (Renner) bei konstanter Spannung von 100 V. Als Größenstandard wurde der 1 kb Marker der Firma Gibco verwendet.

### **2.2.3 PCR (*polymerase chain reaction*)**

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten aus genomischer DNA, cDNA oder aus BAC Plasmiden wurde die Taq-Polymerase (Roche) oder der Expand<sup>TM</sup> High Fidelity Mix von Roche verwendet. Ein typischer Ansatz beinhaltete wie folgt:

- 1x PCR Puffer
- 40 mM dNTP Mix
- 0,1 – 1 µg template DNA
- je 25 – 50 pmol Primer
- 1 U Polymerase
- ad 50-100 µl dest. H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wurde mit folgendem Programm im Thermocycler (Biometra) vervielfältigt:



1. 95° C für 5 Minuten
2. 95° C für 1 Minute
3. 50° C - 58° C für 1 Minute
4. 68° C – 72° C für 20 Sekunden bis 5 Minuten
5. 68° C – 72° C für 10 Minuten

Die Schritte 2. bis 4. wurden zwischen 20 bis 30 mal wiederholt.

### **2.2.3.1 RT-PCR**

2 µg RNA-Extrakt wurde mit 1µl (50 mM) Oligo dT Primern vermischt und für 10 Minuten auf 65° C erhitzt. Anschließend wurde folgender cDNA-Mix hinzugegeben:

- 1x Puffer M-MLV (Promega)
- 2 µl 100 mM DTT
- 0,5 µl RNase Inhibitor (RNAGuard von Amersham)
- 0,5 µl dNTP-Mix (100 mM von Roche)
- ad. 19 µl A. dest. (DEPC)
- 1 µl Reverse Transkriptase M-MLV (USB)

dieser Ansatz wurde für 1 h bei 42° C inkubiert. Anschließend für 2 Minuten auf 4 ° C abgekühlt und für 2 Minuten bei 95° C hitzeinaktiviert. Für die PCR wurden 2 µl aus der cDNA Gemisch eingesetzt.

## **2.2.4 Northern Hybridisierung**

### **2.2.4.1 RNA Isolation aus Säugetier - Zellen**

Die RNA – Isolierung aus humanen Zellen und VSMC erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit von Roche gemäß Herstellerangaben. Die RNA Ausbeute wurde durch optische Messung bei 260 nm bestimmt. Der Qualität der Aufreinigung wurde aus dem Verhältnis von 260 zu 280 nm bestimmt.

### 2.2.4.2 Herstellung von DIG-RNA Sonden

- H<sub>2</sub>O DEPC: 0,1 % DEPC (v / v) in dest. H<sub>2</sub>O; 16 h 37° C anschließend autoklaviert
- Primer: siehe 2.1.1
- DIG RNA Labeling Mix von Roche
- 0,5 M EDTA pH 8,0
- 4 M LiCl
- Ethanol: 70 % und absolut
- RNA Guard (Amersham)

Zur Sondenherstellung benötigt die Zielsequenz an ihrem 3' Ende einen T7 Promotor, der in *antisense* Orientierung liegt. Die T7 RNA Polymerase synthetisiert die *Antisense*-RNA-Sonde und baut die angebotenen mit DIG markierten Uracil-Nucleotide ein.

Als DNA Matrize wurden entweder eine Zielsequenz verwendet, die einen T7 Promotor schon auf ihrem Plasmid besitzen oder die Zielsequenz wurde mit Primern mittels PCR amplifiziert. Einer der PCR – Primer enthält dann die Sequenz des T7 Promotors. Für die Markierung der RNA wurde der DIG RNA Labeling Mix von Roche verwendet. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben ausgeführt. Um noch vorhandene Template DNA zu verdauen wurde 2 µl DNase aus dem Kit dazugegeben und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 1 µl 0,5 M EDTA. Die RNA wurde mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl absolutem Ethanol versetzt. Über Nacht bei – 20° C oder 1 Stunde bei – 70° C wurde der Ansatz gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge) und 4° C wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneut 10 Minuten Zentrifugation und Trocknen des Pellets im Vakuum wurde es mit 100 µl H<sub>2</sub>O DEPC und 1 µl RNA Guard aufgenommen. Das Pellet löste sich nach 1 Stunde bei 37° C.

Die Sonden wurden im Dot Blot getestet. Dafür wurden je 1 µl der Lösungen in einer Verdünnungsreihe (1:10 bis 1:10.000) auf ein Stück Nylonmembran von Roche aufgetragen. Die Membran wurde 3 Minuten UV-Licht ausgesetzt (UV-Tisch), um die RNA auf der Membran zu fixieren. Die Antikörperbehandlung und Detektion der Signale erfolgte nach vorheriger Blockierung der Membran wie unter 2.2.4 beschrieben. Bei einer guten

Sonde ist noch ein Signal bei einer Verdünnung von 1 : 10000 und einer Exposition von 1 Minute zu erkennen.

#### 2.2.4.3 Northern Blot

- Puffer 1: 0,1 M Maleinsäure pH 7,5; 150 mM NaCl; Autoklavieren
- Puffer 2: 1 % Blockingreagenz (Stammlösung 10 %) in Puffer 1, Roche
- Puffer 3: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl
- Laufpuffer: 20 mM MOPS; 5 mM NaAc, 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O DEPC; pH 7,0
- 5x RNA Probenpuffer: 16 µl gesättigte Bromphenolblaulösung; 80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0; 100 µl Ethidiumbromid (10 mg / ml); 720 µl 37 % (=12,3 M) Formaldehyd; 2 ml 100 % Glycerin; 3084 µl Formamid; 4 ml 10 x MOPS Puffer; ad 10 ml H<sub>2</sub>O DEPC; Aliquots bei – 70° C
- Denaturierungslösung: 50 mM NaOH; 1 mM NaCl; in H<sub>2</sub>O DEPC
- Neutralisierungslösung: 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; in H<sub>2</sub>O DEPC
- 20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat, pH 7,0; 0,1 % DEPC (v / v) in dest. H<sub>2</sub>O; 16 h 37° C anschließend autoklaviert
- Hybridisierungslösung: 5 x SSC; 7 % SDS; 0,1 % N—Laurylsarcosin; 1 % Puffer 2; Autoklavieren und anschließend 50 % Formamid
- 1,5 % Agarosegel in 1 x Laufpuffer und 6,3 % Formaldehyd
- anti-dioxogenin -AP Fab-Fragment (Roche) (Anti-DIG-AP)
- Waschpuffer I : 2 x SSC ; 0,1 % SDS ; in H<sub>2</sub>O DEPC
- Waschpuffer I : 0,2 x SSC ; 0,1 % SDS ; in H<sub>2</sub>O DEPC

Zwischen 2 µg und 10 µg RNA wurden in 1 x RNA Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten bei 65° C denaturiert. Das 1,5 % Agarosegel wurde vor dem Probenauftrag für 10 Minuten bei 120 V laufen gelassen. Das Gel mit geladenen Proben lief ca. 1-2 h bei 120 V, dabei wurde der Laufpuffer mit Magnetrührern umgewälzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der eigentliche Blot in einer Vakuumblotaperatur (Amersham). Auf einer porösen Trägerplatte der Apparatur wurde die angefeuchtete Nylonmembran (Roche) gelegt, diese mit einer Maske umrandet und auf die Membran das Gel gelegt. Das Vakuum wurde durch eine Pumpe mit einem Druck von ca.

55 cm \* H<sub>2</sub>O gewährleistet. Das Gel wurde für 10 Minuten mit Denaturierungslösung überschichtet, danach erfolgte 10 Minuten Überschichtung mit Neutralisierungslösung. Anschließend wurde das Gel für mindestens 2 Stunden mit 20 x SSC beschickt. Die auf die Nylonmembran transferierte RNA wurde für 3 Minuten unter UV Licht fixiert. Als Ladekontrolle und Blotkontrolle wurde die rRNA eingelesen. Die Membran wurde bei 68° C in einem Hybridisierungssofen (GFL) mit Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der DIG-RNA Sonde erfolgt bei 68° C über Nacht (ca. 5-20 µl Sonde auf 10 ml Hybridisierungslösung). Die Hybridisierungslösung mit der Sonde kann mehrfach verwendet werden und wird bei – 20° C aufbewahrt. Die Detektion der Hybridisierung wurde wie folgt durchgeführt. Die Membran wurde 2 mal 5 Minuten bei 68° C mit Waschpuffer I gewaschen und anschließend zweimal für jeweils 15 Minuten mit Waschpuffer II behandelt. Die nachfolgenden Reaktionen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde in 1 x Maleinsäurepuffer equilibriert und anschließend in Puffer 2 mindestens 30 Minuten blockiert. 30 Minuten Antikörperbehandlung mit Anti-DIG-AK (1:10000 in Puffer 1). Die Membran wurde 2 mal für 15 Minuten in Puffer 1 gewaschen und anschließend kurz in Puffer 3 equilibriert. Nach 5 Minuten Inkubation mit CDP-Star (Roche) wurden die Signale auf einen Röntgen-Film (Kodak) detektiert.

### **2.2.5 Exonuclease III Verdau**

Exonuclease III katalysiert das schrittweise Entfernen von 5'- Mononukleotiden von doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH – Ende in 3' - 5' Richtung.

Die Ziel - DNA muss einen 3' Überhang und einen 5' Überhang oder ein glattes Ende besitzen. Vom 5' Überhang aus startet der Verdau. Der 3' Überhang ist vor Restriktion geschützt.

- Exonuclease III, 200 U / µl (Fermentas)
- 10 x Exonuclease III Puffer (Fermentas)
- S1 Nuclease, 17 U / µl
- 7,4 x S1 Puffer
- S1 Stop Puffer: 300 mM Tris; 50 mM EDTA

Nach Linearisierung der Ziel – DNA mit einer 3' und einer 5' Überhang produzierenden

Endonuclease, wurde die DNA mit 10 x Exonuclease III Puffer versetzt und bei entsprechender Temperatur gemäß Herstellerangaben 3 Minuten inkubiert. 30 Sekunden nach Zugabe von 500 U Exonuclease III startete der Verdau. Nach gewünschter Abbaurate wurde zwischen 30 Sekunden bis hin zu einer Minute 2 µl von der Exonuclease III Mischung in die S1 Nuclease - Lösung gegeben. Alle Ansätze wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl Stop – Lösung versetzt und bei 70° C für 10 Minuten inaktiviert. 3 µl von dem Ansatz wurde zur Religation verwendet.

### 2.2.6 EMSA

- 10 x EMSA Puffer: 200mM Tris/HCl pH 8.0; 500mM KCl; 200mM EDTA
- 5% PAA-Gel: 5% Polyacrylamid (PAA); 1x TBE (1L 10xTBE: 108g Tris; 55g Boric Acid; 1,3 g EDTA pH 8,3); 5% Glycerin; APS (10% 60 µl in 30 ml) und TEMED (375 µl in 30 ml)

Die *sense* und *antisense* Oligonukleotide (biomers; 300 µM in A.dest) wurden für 5 Minuten bei 95° C gekocht und für 4 h bei RT abgekühlt. Die so annealten Oligonukleotide wurden im EMSA zu 300 µM eingesetzt. Ein Ansatz enthielt:

- 1x EMSA Puffer
- 3% Ficoll (Pharmacia)
- 0,5 mM DTT (Applichem)
- 1 U poly (di/dc) (Sigma)
- 10 µM Oligo (*annealt*)
- 5-10 µg Kernextrakt

Der Ansatz wurde für 20 – 30 Minuten bei 30° C inkubiert und anschließend auf ein nicht denaturierendes 5 % PAA-Gel aufgetragen. Das Gel wurde im Fluoroimager (Fuji-film FIA3000) analysiert.

Für die Kompetitions-Analysen wurden zusätzlich noch ein 10 facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden zugegeben und die Ansätze wurden wie oben angegeben behandelt.

## 2.2.7 Zellkultur

### 2.2.7.1 Zelllinien

Immortalisierte Zelllinien:

|       |   |                        |
|-------|---|------------------------|
| HeLa  | humane Cervix-Karzinomzelllinie; epithelial   | ATCC CCL-2             |
| HUVEC | humane Nabel-Vene Endothel Zellen fusioniert mit permanenten humanen Zelllinie A549 | (Edgell, et al., 1983) |

Primäre Zelllinien:

|      |  |                         |
|------|--|-------------------------|
| VSMC | präpariert aus Karotis von Wistar Ratten | (Meiners, et al., 2002) |
|------|--|-------------------------|

### 2.2.7.2 Medien für humane Zelllinien

Wachstumsmedien:

- BASAL ISCOVE Medium (Biochrom KG); 10 % FKS; 100 U / ml Penicillin; 100 µg / ml Streptomycin (Seromed); 200mM L-Glu (Biochrom)
- RPMI Medium (Biochrom KG); 10 % FKS; 100 U / ml Penicillin; 100 µg / ml Streptomycin (Seromed)
- Dulbecos MEM (Biochrom KG); 10 % FKS; 100 U / ml Penicillin; 100 µg / ml Streptomycin (Seromed); 200mM L-Glu (Biochrom)

Einfriermedium:

- BASAL ISCOVE Medium (Biochrom KG); 10 % FKS; 100 U / ml Penicillin; 100 µg / ml Streptomycin (Seromed); 200mM L-Glu (Biochrom); 10 % DMSO

### 2.2.7.3 Kultur von adhärenenten Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen gemäß ihrer

Wachstumsgeschwindigkeit gesplittet. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale wurden nach einmaligem waschen mit 1 x PBS Trypsin / EDTA Lösung (Gibco) verwendet.

Zur Gewinnung von Lysaten zur proteasomalen Aktivitätsbestimmung wurden die Zellen direkt in der Kulturschale mit destilliertem Wasser und 0,1 % Triton X-100 aufgeschlossen.

#### **2.2.7.4 Kultur von Suspensionszellen**

Nach Erreichen der Konfluenz wurden 90 % der T2 Zellen abgesaugt und mit frischem RPMI Medium aufgefüllt.

#### **2.2.7.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

- Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 % Triton X – 100 ; ALDI (100 µM)

Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und mit Trypsin / EDTA geerntet (s. 2.2.7.3). Das Zellpellet wurde mit 1 x xPBS gewaschen und in ca. 50 µl Lysepuffer pro 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen. Das Lysat wurde 3 x in flüssigem Stickstoff oder bei – 80° C eingefroren und bei RT aufgetaut. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14000 rpm und 4 ° C wurde der Überstand als Gesamtproteinlysate weiter verwendet.

#### **2.2.7.6 Behandlung von Kulturzellen mit Proteasom - Inhibitor**

Für die Behandlung mit Proteasom Inhibitor, wurde das Kulturmedium mit *clasto*-lactystin, MG132 oder ALLM in Konzentrationen zwischen 0,1 bis 10 µM, versetzt. Der Inkubationszeitraum lag zwischen 3 h und 16 h. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel der Inhibitoren (DMSO) verwendet. Die maximale Konzentration lag bei 0,1 % des Kulturmediums.

VSMC wurden vor der Zugabe von Inhibitoren mit 2 % FKS enthaltenden DMEM für

24 h synchronisiert.

#### **2.2.7.7 Behandlung von Kulturzellen mit $\alpha$ - Amanitin**

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von mindestens 70 % kultiviert und mit 2  $\mu\text{g}$  – 50  $\mu\text{g}$   $\alpha$  - Amanitin (Sigma) für 2 h – 16 h versetzt.

#### **2.2.7.8 Transfektion von adhärenenten Zellen**

Transiente Transfektion wurde mit dem kationischen Lipid-Reagenz FuGENE (Roche) durchgeführt. 24 – Loch oder 6 – Loch Platten wurden mit HeLa Zellen beschickt. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60 – 70 % wachsen gelassen. Die nach Herstellerangaben entsprechende Menge FuGENE Reagenz wurde mit serumfreien Medium versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,5  $\mu\text{g}$  – 2  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden DNA wurde zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die der Kulturplatte entsprechende Menge Medium mit Serum wurde mit dem Ansatz versetzt. Die Transfektion wurde mindestens für 3 h im Brutschrank kultiviert bevor eine weitere Behandlung erfolgte.

#### **2.2.7.9 Markierung von Zellen mit $^{35}\text{S}$**

VSMC wurden für 1 h gehungert mit Methionin- und Cystein- freiem Medium (RPMI). Zur Markierung wurden 200  $\mu\text{Ci}$   $^{35}\text{S}$ -L-Methionin (ICN Radiochemicals) verwendet. Die Zellen wurden für 16 h im Brutschrank belassen.

#### **2.2.7.10 Aktivitätsbestimmung der Luziferase**

- Lyse-Puffer: 25 mM Tris-phosphat pH 7,8; 2mM DTT; 2 mM diaminocyclohexanetetraacetic acid (DCTA); 10 % glycerol; 1 % Triton X-100; DTT wurde vor Benutzung als 0,1 M Stocklösung dazugegeben
- 2 x glycyglycine: 50 mM glycyglycine ph 7,8; 30 mM  $\text{MgSO}_4$



- L-Lösung: 1 x glycylglycine; 5 mM ATP
- 0,5 mM Luziferin

Die Luciferase verwandelt das Substrat Luziferin in Gegenwart von molekularen O<sub>2</sub>, ATP und Mg<sup>2+</sup> in Oxoluziferin und CO<sub>2</sub> um. Bei der Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die transfizierten HeLa Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 50 µl Lysepuffer für ein 24-Loch Platte oder 200 µl für eine 6-Loch Platte lysiert. Das Lysat wurde 10 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 4° C bei 14.000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Je die Hälfte des Lysats wurde in ein FACS Röhrchen gegeben und mit 750 µl L-Lösung und 300 µl Luziferin versetzt. Der Ansatz wurde gut durchmischt und im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) für 2 Sekunden gemessen.

#### **2.2.7.11 Aktivitätsbestimmung der Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)**

Zur Bestimmung der CAT Aktivität wurde CAT ELISA von Roche verwendet. Die Messung wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Emission wurde am Plattenreader (Dynatech MR5000) gemessen.

#### **2.2.7.12 Kernprotein-Extraktion**

- Puffer A: 10 mM HEPES pH 7.9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM KCl; 1mM DTT; COMPLETE (Roche); 20mM Na-Fuorid; 0,2 mM Na-Orthavanadate
- Puffer B: Puffer A + 0,1 % NP-40
- Puffer C: 20 mM HEPES; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM DTT; 25 % (v/v) Glycerol; COMPLETE; 20 mM Na-Fourid; 0,2 mM Na- Orthavanadate
- Puffer D<sub>Modified</sub>: 20mM HEPES pH 7,9; 20 % (v/v) Glycerol; 20 mM Na-Fourid; 0,2 mM Na- Orthavanadate; COMPLETE
- Puffer D<sub>Regular</sub>: Puffer D<sub>Modified</sub> + 0,1 M KCl

Trypsinierte und pelletierte Zellen wurden in zwei Volumenteilen Puffer B vorsichtig re-

suspendiert. Alle Schritte geschahen auf Eis. Das Gemisch wurde ca. 5 Minuten inkubiert bis die Zellen lysiert waren (Mikroskopkontrolle). Das Lysat wurde bei maximaler Drehzahl in einer Tisch-Kühlzentrifuge pelletiert. Der Überstand besteht aus cytoplasmatischen Proteinen und wurde in Puffer D<sub>Regular</sub> 1:3 verdünnt und bei – 80° C gelagert. Das Pellet (Zellkerne) wurde mit 1 ml Puffer A gewaschen und wie oben beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde in 2/3 Volumenteilen Puffer C resuspendiert und ca. 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Kerne quellen erst auf und schrumpfen dann wieder (Mikroskopkontrolle). Das Gemisch wurde wie oben beschrieben pelletiert und der Überstand wurde 1:4 in Puffer D<sub>Modified</sub> aufgenommen. Die Kernproteine konnten bei –80° C gelagert werden.

### **2.2.7.13 Hitze Schock an transfizierten HUVEC**

HUVEC wurden in 6 Well Platten bis zu einer Konfluenz von 70 % angezogen und wie unter 2.2.7.8 beschrieben transfiziert. Die Transfektion wurde ü.N. stehen gelassen. Die Zellkulturschale wurde anschließend 1 h im 42° C Wasserbad inkubiert und für 2 h bei 37° C erholen lassen. Die Zellen konnten nun weiter bearbeitet werden.

## **2.2.8 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.8.1 SDS PAGE (SDS – Polyacrylamidelectrophorese) nach Lämmli**

- Lämmli – Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
- 1 x Probenpuffer: 50 mM Tris.HCl pH 6,8; 1 % SDS; 12,5 % Glycerin; 0,01 % Bromphenolblau; 125 mM DTT
- 4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4 % SDS
- 4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS
- 30 % Acrylamidlösung: Acrylamid:Bisacrylamid = 37,5 %:1 % 12,5 oder 15 %ige Polyacrylamid – Trenngele in 1 x Trenngelpuffer mit 5 % Polyacrylamid – Sammelgelen in 1 x Sammelgelpuffer, versetzt mit 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED

Die Methode wurde nach Lämmli (1970) modifiziert. Mit dieser Methode werden Protei-

ne entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in SDS – Gelen aufgetrennt. Es wurden 0,75 mm dicke Gele mit einer Lauflänge von 6 cm verwendet. Der Lauf wurde mit Lämmli – Puffer durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf 1 x Probenpuffer eingestellt und bei 100° C 5 Minuten denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte im Mighty Small System S250 von Hoefer / Pharmacia bei konstantem Strom (15 mA im Sammelgel; 35 mA im Trenngel; 200 V maximal).

### **2.2.8.2 Western Blot Analyse**

- TBS – T: 50 mM Tris-HCl pH 7,6); 150 mM NaCl; 0,1 % TWEEN 20
- Transferpuffer: 25 mM Tris; 125 mM Glycin; 10 % Methanol; pH 8,3 – 8,7
- Blocking – Lösung: TBS; 0,1 % TWEEN 20; 2,5 % Magermilchpulver; 462  $\mu$ M NaN<sub>3</sub>
- Amidoschwarzlösung: 0,1 % Amidoschwarz; 45 % Methanol; 10 % Essigsäure

Nach der SDS – PAGE wurden die Proteine für 1 h bei konstanten Strom von 1,5 – 2 mA / cm<sup>2</sup> , maximal 400 mA pro Blotapparatur, aus dem Gel auf eine PVDF Membran (0,45  $\mu$ m Porengröße, Millipore) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Apparatur von PeqLab im Semidry – Verfahren, wobei sich zwischen Gel und Kathode bzw. zwischen Membran und Anode jeweils 3 Lagen in Transferpuffer getränkten Whatmann – Papiers befanden. Zum Nachweis des erfolgreichen gleichmäßigen Proteintransfers wurde die Membran mit Amidoschwarzlösung angefärbt.

Durchführen der Antikörper- und Färbereaktion:

(alle Reaktionen auf dem Schüttler und bei RT)

1. Blockierung der Membran: 1 h mit Blocking – Lösung
2. Inkubation mit in Blocking – Lösung verdünnten 1. Antikörper bei 4° C über Nacht.
3. 2 x 20 Minuten Waschen mit TBS – T
4. Inkubation mit dem 2. Antikörper: anti – mouse bzw. anti – rabbit konjugiert mit Meerrettich – Peroxidase in Blocking – Lösung für mind. 1 h
5. 2 x 20 Minuten Waschen mit TBS – T

6. Inkubation mit ECL plus (Amersham). Die Detektion der Chemiluminiszenz – Signale erfolgte mit Kodak X – Omat DS Filmen.

### 2.2.8.3 Dichtegradientenzentrifugation

- Gradientenpuffer: 50 mM Tris – HCl pH 7,5; 50 mM NaCl ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

Es wurden Gradienten im SW 40 – Ultrazentrifugenröhrchen mit einer Saccharosekonzentration von 40 % - 10 % gegossen und ca. 3 mg Protein aus Gesamtproteinlysaten aufgetragen. Die Gradienten wurden 15 Std. und 59 Min. bei 4° C und 40000 rpm im SW 40 Rotor zentrifugiert und der Gradient von unten gezapft (40 %) und in 500 µl Aliquots abgefüllt.

### 2.2.8.4 Immunopräzipitation

- Lysepuffer: PBS; 0,5 % NP40
- Waschpuffer: 2 x PBS; 0,1 % NP40
- *Slurry*: PBS; Proteinsepharose A / Proteinsepharose G (Roche) Verhältnis 4:1
- Fixierer: 40 % Methanol; 10 % Essigsäure
- Verstärkerlösung: Amplifie (Amersham)

Zwischen 0,5 – 1 x 10<sup>7</sup> CPM VSMC Zelllysate wurden für jeden Immunopräzipitation Ansatz eingesetzt. *Slurry* wurde 1/10 eingesetzt. Zusätzlich wurde ca. 1/10 Präimmuneserum eingesetzt und 16 h bei 4° C auf einem Inkubationsrad drehen gelassen. Der Ansatz wurde 1 Min. bei 14.000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde mit 50 µl *Slurry*, 10 % Glycerol, 5 mM ATP und 5 µl K08 Antikörper beschickt und für 1 h bei 4° C auf dem Inkubationsrad drehen gelassen. Nach Sedimentation des *Slurry* in einer Tischzentrifuge für 1 Min. bei 14000 rpm wurde das Sediment 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde mit PBS das *Slurry* einmal mit dest. Wasser gewaschen und anschließend wurde das Volumen bei 100° C reduziert. Zur Vorbereitung des Präzipitats für die Auftrennung auf einer SDS – PAGE wurde der Ansatz für 5 Min. bei 100° C gekocht. Der Überstand wurde auf ein SDS – PAGE aufgetragen. Das Gel wurde 10 Min. mit dem Fixierer fixiert und im Verstärkerlösung für 30 Min. behan-

delt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und die Signale mittels (Fujifilm) Screen und (Kodak) Film detektiert.

#### **2.2.8.5 Aktivitätsbestimmung des Proteasoms**

Zur Aktivitätsbestimmung des Proteasoms in Kulturzellen wurden die Zellen in der Zellkulturschale mit A. dest + 0,1 % Triton X-100 lysiert. 10 µg des Lysats wurde im Aktivitätstest wie folgt eingesetzt:

- 50 mM Tris/HCl pH 8,2
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 40 µM Suc-LLVY-AMC
- 10 µg Lysat

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Der Aktivitätstest wurde im Fluostar SLT bei einer Excitation von 390 nm und einer Emission von 460 nm (AMC) gemessen. Der "Gain" betrug 35, die Anzahl der "Blitze" 30.

#### **2.2.8.6 Proteinbestimmung**

Die Quantifizierung von löslichen Proteinen erfolgte mit dem „Protein Assay dye reagent concentrate“ von BioRad nach Bradford (1976). Es wurde das Herstellerprotokoll befolgt. Die Bestimmung der OD erfolgte bei 595 nm in Küvetten im „Ultraspec III“ Photometer von Pharmacia.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Regulation von POMP durch Interferon $\gamma$

Durch Interferon  $\gamma$  wird eine Veränderung in der Zusammensetzung der proteasomalen Untereinheiten ausgelöst. Dabei werden die Untereinheiten  $\beta 1(\delta)$ ,  $\beta 2(Z)$  und  $\beta 5(MB1)$  über *de novo* Formation durch so genannte Immununtereinheiten  $\beta 1i(LMP2)$ ,  $\beta 5i(LMP7)$  und  $\beta 2i(MECL-1)$  ersetzt. Außerdem wird durch Einfluss von Interferon  $\gamma$  die mRNA von POMP signifikant stimuliert (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Da das Helferprotein POMP die Biogenese des konstitutiven Proteasoms unterstützt, kann man aufgrund der Interferon  $\gamma$ -Induktion von POMP vermuten, dass auch die Biogenese des Immunoproteasoms beeinflusst wird. Die transkriptionelle Induktion der Immununtereinheiten  $\beta 1i(LMP2)$  und  $\beta 2i(MECL-1)$  durch Interferon  $\gamma$  ist bereits beschrieben (Barton, et al., 2002; Brucet, et al., 2004; Foss and Prydz, 1999). Allerdings war weder die Genstruktur, noch der Promotorbereich von POMP bekannt. Durch Datenbankrecherche sollte die Genstruktur untersucht und potentielle Bindungsstellen für Interferon  $\gamma$  induzierte Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

#### 3.1.1 Genstruktur von POMP

Um die Interferon  $\gamma$ -Induktion der POMP mRNA zu untersuchen, wurde zunächst die Genstruktur anhand von Datenbankanalysen ermittelt. Dazu wurden die cDNA Einträge mit der humanen genomischen Sequenz verglichen. Das POMP-Gen umspannt einen DNA-Bereich von 19,7 kb auf dem Chromosom 13 und gliedert sich in 6 Exons. Die Exongröße variiert zwischen 61 Basen (Exon 3) und 888 Basen (Exon 6), während die 5 Introns zwischen 2001 Basen (Intron 2) und 5602 Basen (Intron 5) groß sind. Der offene Leserahmen endet am Anfang des 6. Exons, so dass sich eine kleine 84 bp lange 5'-untranslatierte Region (UTR) und eine mit 888 bp sehr große 3'-UTR ergibt. Der translatierte Bereich beginnt am Ende des 1. Exons und umfasst 423 bp, die für ein 141 Aminosäuren großes Protein kodieren. In 5'-Richtung des 1. Exons liegt die putative Promotorregion, die experimentell bestätigt werden sollte (s. Abb. 3).

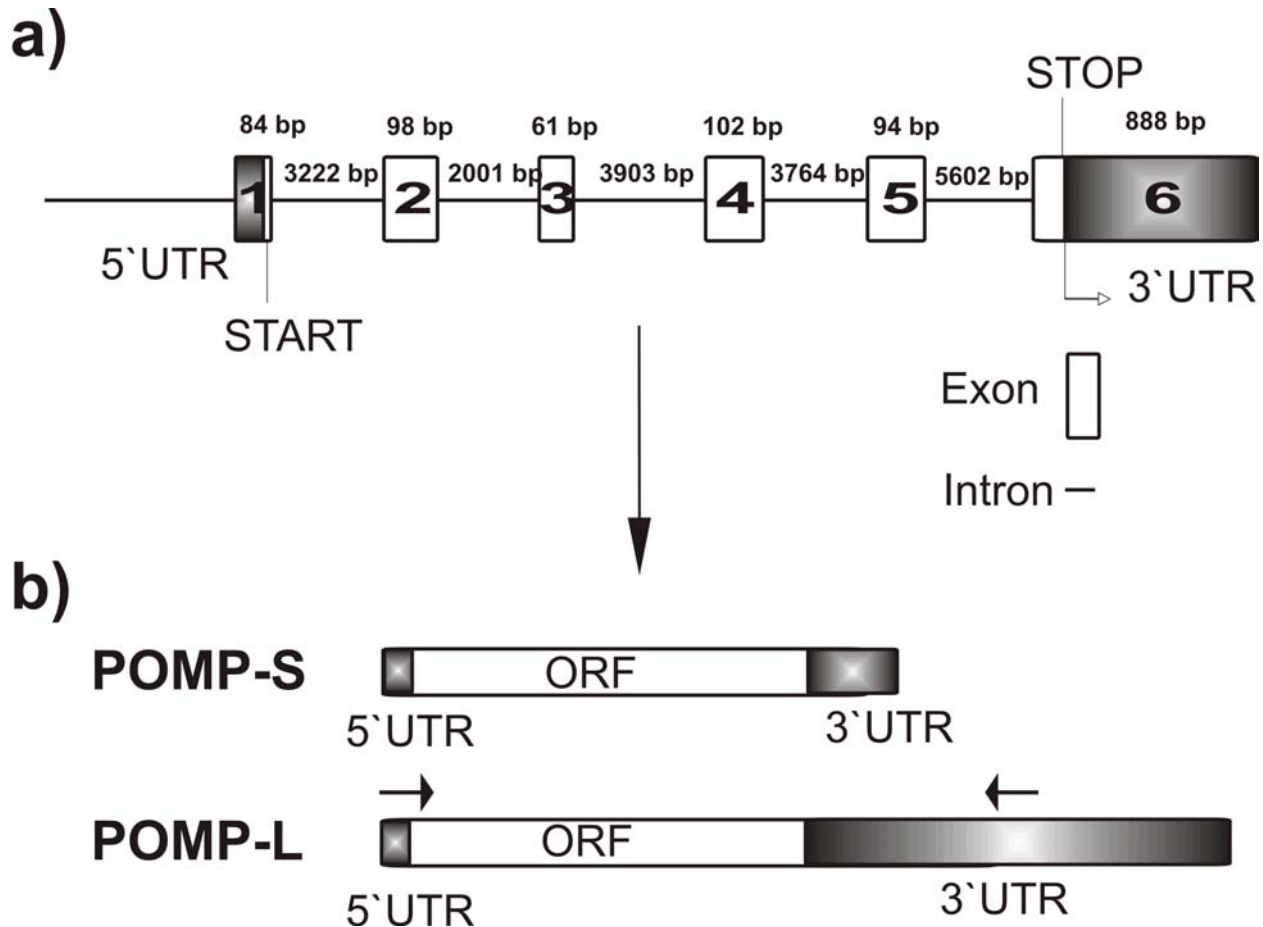


Abb. 3: **Genregion von POMP**

a) Schematische Darstellung der Genregion von POMP basierend auf cDNA (Acc.-Nr.: NM\_015932) Sequenzvergleichen mit genomischen Sequenzen (Acc.-Nr.: AL359454) durch NCBI-BLAST. Exons sind durch Kästchen und Introns durch Striche zwischen den Kästchen dargestellt. Die jeweiligen Größen sind in Basenpaaren (bp) über den Exons und Introns angegeben. Die UTR-Bereiche sind dunkel hervorgehoben, mit Angabe der Lage von Start- und Stop-Kodons.

b) Dargestellt sind die aus cDNA-Sequenzen entnommenen Transkriptvarianten von POMP. Die Sequenzen unterscheiden sich allein in der Länge ihrer 3'-UTR-Region. Die kürzere Variante wurde als POMP-S (S für *short*) bezeichnet, während die lange Variante POMP-L (L für *long*) genannt wurde. Die UTR Bereiche sind dunkel hervorgehoben und entsprechend gekennzeichnet. Die Pfeile über der POMP-L-Variante gibt die Positionen der Oligonukleotidsequenzen der RT-PCR in Abb. 4 an.

Ausgehend von der Nukleotidsequenz der ursprünglich durch Datenbankvergleich der Aminosäuresequenz ermittelten cDNA (NCBI-Datenbank, Eintrag: AF125097; (Witt, et al., 2000), konnten sieben weitere dazu homologe cDNA-Sequenzen gefunden werden. Die ermittelten Transkripte variieren in der Position des Transkriptionsstartpunktes und

in der Länge der mRNA-Sequenz.

Die cDNA's sind zwischen 600 bp und 1300 bp groß, wovon drei der sieben Sequenzen ca. 600 bp groß sind. Fünf der sieben cDNA Sequenzen besitzen ein Poly A-Signal. Die unterschiedlichen Transkriptvarianten, die sich aus dem Vergleich der cDNA-Sequenzen ergeben sind in Abb. 3b schematisch dargestellt. Die Einträge der cDNAs wurden genau analysiert. Eine der Sequenzen mit dem NCBI-Datenbank-Eintrag AF262975 kodiert für ein akzessorisches Protein, welches mit der Untereinheit  $\beta$  4.1 des spannungsabhängigen Kalium-Kanals interagiert und homolog zu der POMP-mRNA ist (Tian, et al., 2002). Eine weitere mRNA-Sequenz mit der *Accession* Nummer AF275807 weist eine Punktmutation auf, so dass der Leserahmen länger ist. Der offene Leserahmen umfasst hier 483 Nucleotide und resultiert in 161 Aminosäuren. Zur Verifizierung der aus den Sequenzdaten entnommenen verschiedenen Transkript-Größen wurden Oligonukleotide verwendet, die im 3' UTR und im 5'-UTR Bereich des POMP-Gens binden (s. Position der Oligonukleotide in Abb. 3b). Wie in Abb. 4b zu erkennen ist, konnte der ca. 900 bp große Bereich aus HeLa cDNA mittels RT-PCR amplifiziert werden. Damit wurde die Existenz des POMP-L-Transkripts bestätigt. Die 600 bp lange POMP-S-mRNA Variante konnte durch Northern Blot-Analysen ermittelt werden (s. Abb. 4a). Die Größe der mRNA wurde in diesem Fall anhand der Größenstandards des Northern Blots bestimmt. Bemerkenswert war, dass die POMP-L-mRNA nur schwach oder gar nicht in den Northern Blot-Analysen zu detektieren war (s. Abb. 4).



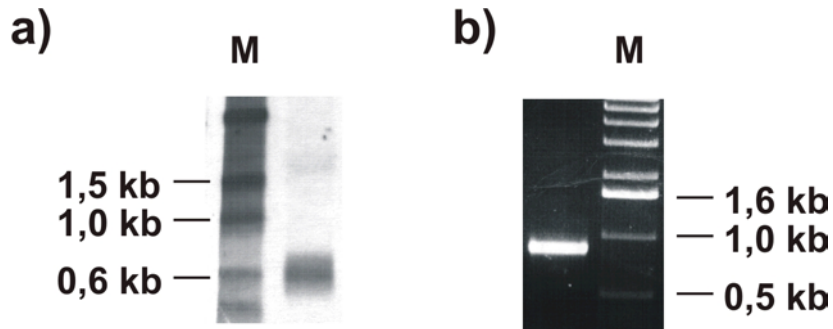


Abb. 4: **Charakterisierung der POMP Transkripte**

Nachweis der Existenz der zwei unterschiedlichen POMP mRNA-Größen durch:

a) Northern Blot: 5 µg Gesamt-RNA aus unbehandelten HeLa-Zelllysaten wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. DIG-markierte POMP Gegenstrang-RNA wurde als Sonde verwendet. (Bande über 1,5 kb unspezifisch; M = Marker)

b) RT-PCR: Es wurden 2 µl cDNA aus RNA von unbehandelten HeLa-Zellen als Matrize in der PCR verwendet. 900 bp Produkt wurde mit RACEUMP Primern (s. Abb. 3b) amplifiziert (M = Marker).

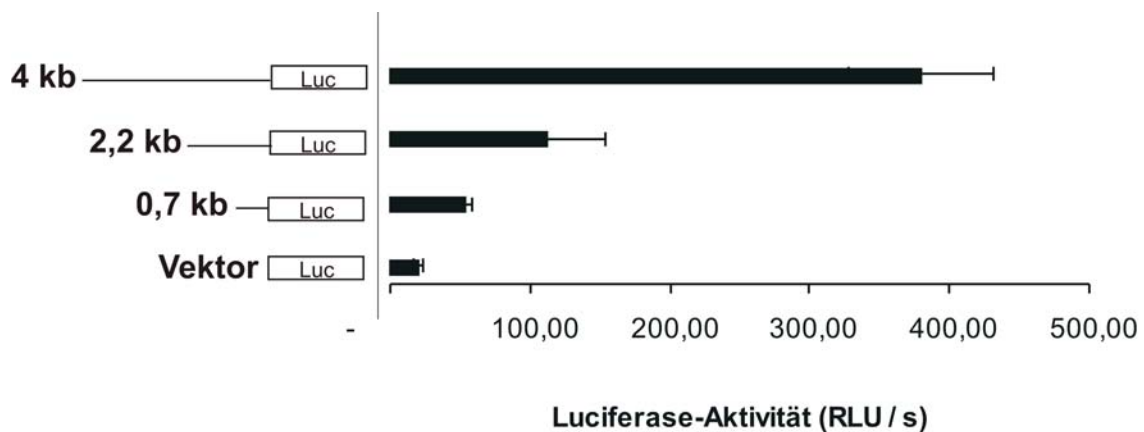
In Northern Blot-Analysen mit humanen Gewebe konnten zwei größere Transkripte identifiziert werden, die in etwa die Größen der POMP-L-mRNA entsprachen (Dr. E. Krüger, persönliche Mitteilung). Nach dem Beleg der Existenz beider mRNA-Varianten von POMP sollte untersucht werden, wie die Regulation nach Interferon  $\gamma$  Signal gesteuert ist. Die Nukleotid-Sequenz im 5'-Bereich dieser mRNA-Varianten sind identisch. Daher wurde zunächst auf die Charakterisierung des vermeintlichen Promotorbereichs fokussiert.

### 3.1.2 Reportergenfusion des putativen POMP Promotors

Zur Untersuchung des putativen Promotor-Bereichs von POMP wurde die Nukleotid-Sequenz *upstream* des mRNA Startpunktes auf mögliche Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren durchsucht. Es konnten keine Bindesequenzen für Interferon  $\gamma$  aktivierte Transkriptionsfaktoren *upstream* des mRNA-Startpunktes identifiziert werden. Die Analyse wurde bis 2 kb in 5'-Richtung des Translationsstartpunktes durchgeführt.

Drei unterschiedlich lange Bereiche der potentiellen Promotorregion wurden zur Bestimmung des Promotorbereiches mit einem Reportergen fusioniert. Dies gewährleistete, dass auch die Sequenzen möglicher *Enhancer*-Elemente, die sich sehr weit *upstream* des Transkriptionsstarts befinden konnten, mit einbezogen wurden.

Fragmente von 0,7 kb, 2,2 kb und 4 kb Größe *upstream* des putativen Transkriptionsstarts wurden mit dem genomischen Klon RP11 (Sanger Center) als Matrize amplifiziert. Die drei unterschiedlich langen Fragmente wurden durch Ligation in den Reporter-Vektor pXP-2 oder pGL2basic eingebaut. Die Funktionalität dieser Elemente wurde in einem Luciferase-Reportergen-Assay analysiert (s. Abb. 5). Dazu wurden die Konstrukte in HeLa Zellen transfiziert. Nach 16h Expressionsdauer wurde die Aktivität der Luciferase im Zelllysats gemessen.



**Abb. 5: Der 5'-Bereich von POMP besitzt Promotoraktivität**

Luciferase-Reportergen-Assay: Die Konstrukte von POMP-Promotoren unterschiedlicher Größe in Fusion mit dem Reportergen Luciferase wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Auf der linken Seite sind die Längen der Promotorbereiche in kb angegeben (vom ATG in 5'-Richtung gemessen) und graphisch dargestellt (Die Boxen stellen die Lage des Reportergens Luciferase [Luc] dar). 24 h nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten gemessen. Die Aktivität ist in RLU / s angegeben und wurde jeweils aus drei Proben gemittelt. Die Standardabweichung ist am rechten Ende des jeweiligen Balkens angegeben. Als Kontrolle wurde der Leervektor (Vektor) ohne Promotor verwendet.

Die Luciferase-Aktivität basierte auf der jeweilige Promotoraktivität. Bei einer Aktivität, die größer war als die der Kontrolle ohne Promotor, wurde dem DNA-Bereich Promotoraktivität zugesprochen. Bei allen drei Konstrukten war die Luciferase-Aktivität deutlich stärker als bei der Kontrolle. Es konnte nun davon ausgegangen werden, dass es sich hier um einen Promotor handelte. Bemerkenswert war, dass die Aktivität der Luciferase nahezu linear mit der Länge der DNA Konstrukte zunahm. Das lässt auf verschiedene regulatorische Komponenten weit entfernt des Transkriptionsstartpunktes schließen.

Nachdem nun die Sequenz in 5'-Richtung des Translationsstartpunktes als Promotor

bestätigt wurde, konnte mit der Charakterisierung dieses Abschnitts begonnen werden. Dazu wurde zunächst die DNA-Sequenz der 5'-UTR der mRNA untersucht, da diese einen Einfluss auf deren Genexpression haben kann (Wilkie, et al., 2003). Bei dem Gen POMP umspannt diese Region nur etwa 80 Basenpaare. Um den Effekt auf die Expression zu untersuchen, sollte ein Klon ohne 5'-UTR generiert werden. Da zum Zeitpunkt der Erstellung des Klons die längeren Varianten der 5'-UTR noch nicht bekannt waren, wurde ab Position -48 ein Klon generiert und dessen Luciferase-Aktivität gemessen. Die Sequenz wurde aus der cDNA mit der Accession Nummer BC003390 entnommen. In Abb. 6 ist der Vergleich der Expressionsklone des POMP-Promotors mit und ohne 5'-UTR dargestellt. Im Vergleich ist die Aktivität der Luciferase ohne 5'-UTR ein wenig stärker, so dass davon auszugehen ist, dass der untersuchte Bereich der 5'-UTR die Aktivität leicht reprimiert (s. Abb. 6).

Weiterhin wurde der Promotor charakterisiert, indem der Bereich des Minimalpromotors eingegrenzt wurde. Zur Messung der basalen Promotoraktivität wurde ein Bereich von 200 bp in 5' Richtung des Transkriptionsstarts deletiert und deren Luciferase-Aktivität ermittelt (Klon 0,7 kb -200; s. Abb. 6). Ohne die ersten 200 Basen vor dem Translationsstart konnte keine Luciferase-Aktivität gemessen werden, so dass dort der Minimalpromotor sein muss.

Die Sequenz der 5' UTR des POMP-Promotors hat einen Einfluss auf die Transkription. Außerdem sind die ersten 200 Basen des Promotors essentiell für dessen Aktivität und können als Basis-Promotor bezeichnet werden. Weiter *upstream* befinden sich vermutlich Bindungssequenzen an denen Regulatorproteine andocken können. *Enhancer*-Proteine binden, aufgrund der deutlich gesteigerten Aktivität der größeren Promotorfragmente, wahrscheinlich in den Regionen von 700 bp bis 4000 bp. Da nun der Promotorbereich eingegrenzt wurde, konnte seine Regulierbarkeit auf Interferon  $\gamma$  Stimulation näher untersucht werden.

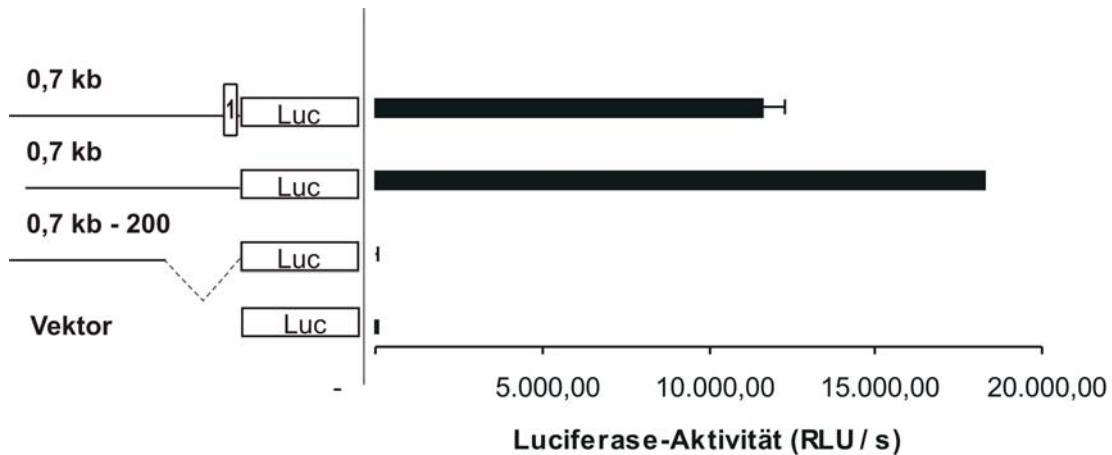


Abb. 6: **Charakterisierung des 0,7 kb Promotors von POMP**

Luciferase-Reportergen-Assay: Mit den drei POMP-Promotor Konstrukten wurde der Einfluss der 5'-UTR und der Minimalpromotor festgelegt. HeLa-Zellen wurden mit den Konstrukten 0,7 kb POMP Promotor mit 5'-UTR (Konstrukt 0,7 kb mit Kästchen (Exon1) vor der Luciferase Box), 0,7 kb POMP-Promotor ohne 5'-UTR (0,7 kb) und POMP-Promotor ohne die ersten 200 Basen vor dem ATG (0,7 kb -200) transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 24h nach der Transfektion im Zelllysate gemessen. Die Aktivität ist in RLU / s angegeben und wurde jeweils aus drei Proben gemittelt. Die Standardabweichung am rechten Ende des jeweiligen Balken angegeben. Als Kontrolle wurde der Leervektor (Vektor) ohne Promotor verwendet.

HeLa Zellen wurden mit den in Abb. 7 dargestellten Reportergenfusionen transfiziert und anschließend mit 200 U / ml Interferon  $\gamma$  behandelt.

Die Luciferase-Aktivität war bei Interferon  $\gamma$ -Stimulation (helle Balken) der Zellen für die drei unterschiedlich langen POMP Promotorbereiche reduziert im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (dunkle Balken). Als Positivkontrolle wurde der als Interferon  $\gamma$  induzierbar beschriebene MECL-1-Promotor verwendet (Foss and Prydz, 1999). Die Aktivität des MECL-1-Promotors wurde bei Interferon  $\gamma$ -Zugabe ca. 4fach verstärkt. Wie diese Ergebnisse zeigen konnten, ist der POMP-Promotor nicht durch Interferon  $\gamma$  stimulierbar, sondern wird gegenüber der Kontrolle reprimiert.

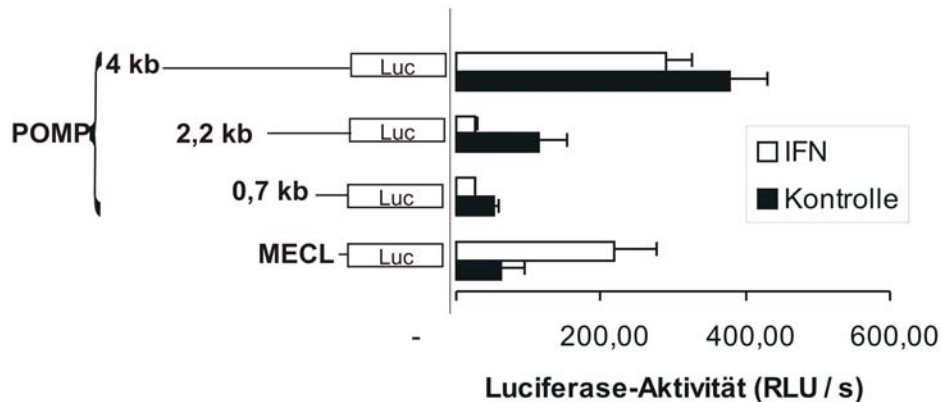


Abb. 7: **Interferon  $\gamma$  reprimiert die Aktivität des POMP- Promotors**

Luciferase-Reportergen-Assay: HeLa-Zellen wurden mit drei POMP-Promotor Konstrukten unterschiedlicher Größe und der positiv Kontrolle (MECL) transfiziert (POMP Konstrukte siehe auch Abb. 5). Als positiv Kontrolle wurde der MECL-1-Promotor verwendet (Foss and Prydz, 1999). 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit 200 U/ml Interferon  $\gamma$  (IFN - helle Balken) oder ohne Interferon  $\gamma$  (Kontrolle - dunkle Balken) versetzt. Das Diagramm zeigt die gemessene Luciferase-Aktivität des Zelllysates. Die Werte wurden aus drei unterschiedlichen Proben gemittelt.

Aufgrund der Reportergen-Analysen ist die vermehrte Expression der mRNA von POMP in Abhängigkeit von Interferon  $\gamma$  nicht auf die Promotor-Aktivität zurückführen. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung von Transkription kann auch durch Sequenzen in den Introns gewährleistet werden. So wurden zum Beispiel im Mimecan-Gen im ersten Intron zwei Sequenzen für funktionelle *interferon-stimulated response elements* (ISRE) gefunden, die die Transkription beeinflussen (Tasheva, 2002).

Mehrere putative  $\gamma$ -IRE ( $\gamma$ -Interferon response elements) *cis-acting* Bindungsstellen wurden innerhalb des ca. 3 kb großen Introns 1 des POMP Gens identifiziert. Um die Funktionalität dieser Elemente zu überprüfen, wurden mehrere Reportergenkonstrukte, die die Sequenz des Intron 1 enthalten generiert. Die Sequenz der kompletten Genregion des 0,7 kb großen Promotorfragmentes bis zum Exon 2 wurde hierfür verwendet. Mittels RT-PCR wurde getestet, ob das Intron 1 korrekt aus dem Konstrukt gespleißt wurde (s. Abb. 9b).

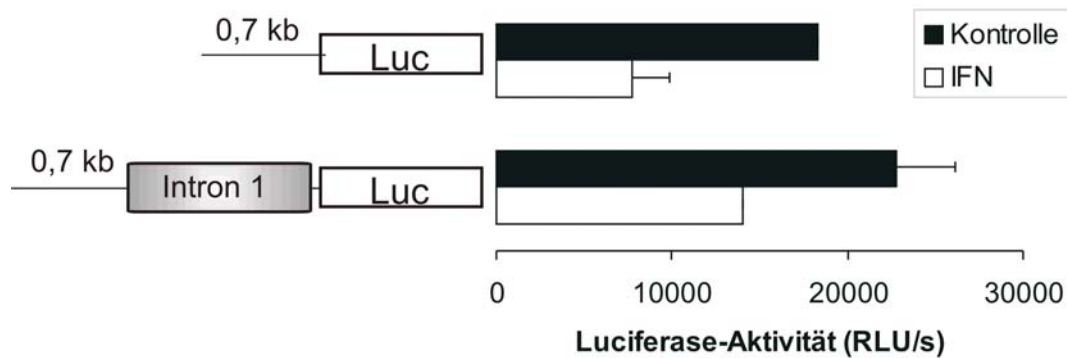


Abb. 8: **Das Intron 1 des POMP Gens hat keinen Einfluss auf die Interferon  $\gamma$  Regulation**  
 Luciferase-Reportergen-Assay: HeLa-Zellen wurden mit 0,7 kb großem POMP-Promotor (oberes Konstrukt; 0,7kb) und mit der Genregion von POMP (0,7 kb POMP-Promotor mit Intron 1, s. unteres Schema) transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen wie in Abb. 7 beschrieben behandelt. Das Diagramm zeigt die gemessene Luciferase-Aktivität des Zelllysates. Die Werte wurden aus drei unterschiedlichen Proben gemittelt.

Die Funktionalität des  $\gamma$ -IRE Elements konnte mittels Luciferase Aktivität nicht bestätigt werden. Denn die Luciferase-Aktivität des Konstruktes inklusive Intron 1 wurde in vergleichbarem Maße durch Interferon  $\gamma$  reprimiert, wie die Aktivität des Konstruktes ohne Intron 1 (s. Abb. 8).

Das erste Intron spielt also keine Rolle bei der Interferon  $\gamma$ -Stimulation. Da es aber bei Interferon  $\gamma$ -Stimulation zu einer vermehrten Bildung der POMP mRNA kommt, könnte dies auf eine posttranskriptionelle Kontrolle zurückzuführen sein.

Die mRNA POMP-L besteht zur Hälfte aus 3'-UTR (s. Abb. 3), was die Wahrscheinlichkeit auf stabilisierende Elemente auf der mRNA erhöht. Um die Funktion dieses großen Bereiches der mRNA zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Konstrukte generiert. Die 3'-UTR wurde aus dem Genom amplifiziert und in einen Vektor mit einem Cytomegalovirus-Promotor (CMV) ligiert. Der so entstandene DNA Bereich umfasste nun ein Luciferase-Gen unter Kontrolle eines CMV-Promotors (CMV + Luciferase + 3'-UTR in Abb. 9). Dieser Vektor wurde als Grundkonstrukt verwendet. Wie in Abbildung 8 dargestellt, wurden vier unterschiedliche Vektoren hergestellt. Drei davon enthielten die Sequenz des 3'-UTR-Bereich von POMP. Der CMV-Promotor wurde aus dem Vektor CMV + Luciferase + 3'-UTR entfernt und durch den 0,7 kb großen POMP-Promotor ersetzt (0,7kb + Luciferase + 3'-UTR; s. Abb. 9). Weiterhin wurde hinter den POMP-Promotor das erste Intron eingefügt, so dass der komplette Promotorbereich bis zur

Region um Exon 2 auf diesem Vektor vorhanden war (0,7 kb + I1 + Luc + 3'-UTR; s. Abb. 9). Alle drei Konstrukte wurden wie zuvor beschrieben in HeLa Zellen transfiziert und die Zellen wurden anschließend für 24h mit je 200 U/ml Interferon  $\gamma$  behandelt (s. Abb. 9a). Als Kontrolle für die Interferon  $\gamma$ -Induktion dienten der Promotor von MECL-1 und das Konstrukt mit dem 0,7 kb POMP-Promotor allein (0,7kB; s. Abb. 9).

In Abb. 9a ist die Induktion des Reportergens relativ zur unstimulierten Kontrolle aufgezeigt. Die Balken resultieren aus dem Quotienten aus der Luciferase-Aktivität von stimulierten Zellen gegenüber der Luciferase-Aktivität unstimulierter Zellen. Bei allen angegebenen Konstrukten war die Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von Interferon  $\gamma$  reduziert gegenüber der Kontrolle. Des weiteren wurde über RT-PCR nachgewiesen, dass das Intron 1 korrekt gespleißt und die 3'-UTR transkribiert wurde (s. Abb. 9b). Die erhöhte mRNA-Menge von POMP nach Interferon  $\gamma$ -Stimulation ließ sich aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung nicht auf die Erhöhung der Transkriptionsinitiations-Rate zurückführen. Ein Einfluss der POMP-L mRNA-Form auf eine posttranskriptionelle Stabilisierung konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

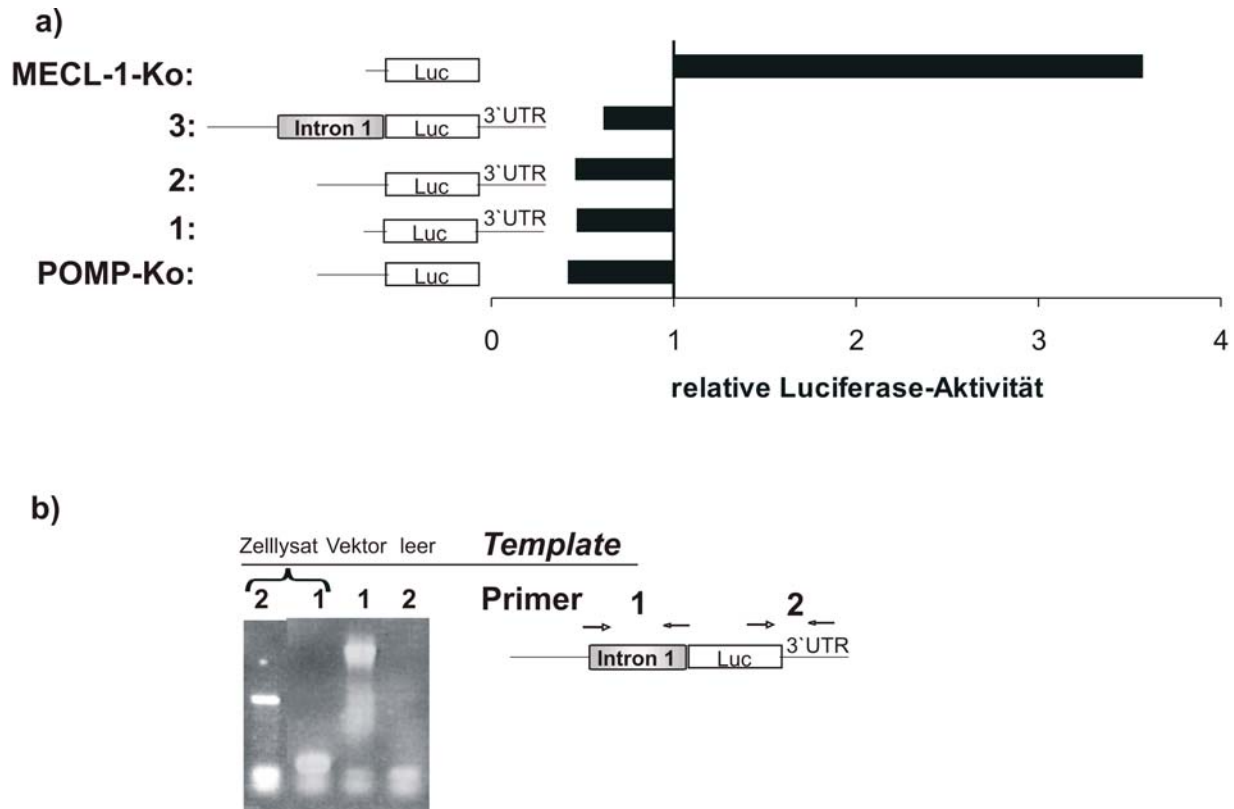


Abb. 9: Die 3'-UTR der POMP-L mRNA zeigt keinen stabilisierenden Effekt nach Interferon  $\gamma$ -Stimulation

a) Luciferase-Reportergen-Assay: HeLa-Zellen wurden mit drei 3'-UTR POMP-Konstrukten transfiziert: 1. 3'-UTR mit CMV-Promotor (Lage der Komponenten im Schema CMV + Luciferase + 3'-UTR); 2. 3'-UTR mit 700 Basen großem POMP-Promotor ; 3. 3'-UTR mit Genregion 700 Basen POMP-Promotor und Intron 1. Als Kontrollen wurden der MECL-1-Promotor (Foss and Prydz, 1999) und der 700 Basen große POMP-Promotor ohne 3'-UTR transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24h mit 200 U/ml Interferon  $\gamma$  oder ohne Interferon  $\gamma$  (Kontrolle) versetzt. Das Diagramm zeigt die relative Luciferase-Aktivität im Verhältnis zur Kontrolle.

b) RT-PCR: HeLa-Zellen wurden mit dem Konstrukt Nummer 3 aus Abb. 9a transfiziert. Nach 24 h wurde aus dem Zelllysats cDNA isoliert und anschließend als Template für die PCR mit folgenden Primern benutzt Primerpaar 1: Primer um Intron 1 (s. Schema neben dem Bild) Primerpaar 2: Primer in Luciferase – Gen und 3'-UTR von POMP-L. Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt als *Template* mit dem Primerpaar 1 amplifiziert. Ungespleißt wird ein Amplifikat von ca. 3 kb Größe erlangt. Als Negativkontrolle wurde Wasser als *Template* verwendet (s. leer). Schematische Darstellung der Primerpositionen (Pfeile über der schematischen Darstellung des Konstruktes)

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die 0,6 kb große POMP-S-mRNA Variante stabilisiert wird. Daher wurde die mRNA Stabilität von POMP-S durch den RNA Polymerase II-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin überprüft. HeLa Zellen wurden nach Stimulation mit Interferon  $\gamma$  für 4 Stunden mit diesem Hemmstoff behandelt und im Anschluss die Menge an POMP mRNA in Northern Blots verglichen (s. Abb. 10)



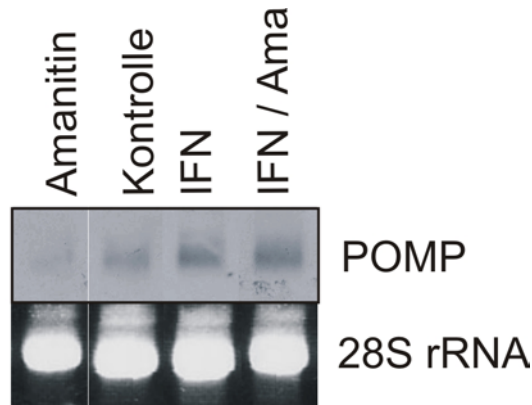


Abb. 10: **POMP-S-mRNA wird durch Interferon  $\gamma$  Behandlung stabilisiert**

Northern Blot: HeLa-Zellen wurden für 24 h mit 200 U / ml IFN $\gamma$  behandelt (Spuren IFN und IFN / Ama) und anschließend zusätzlich für 6 h mit 2,5  $\mu$ g / ml  $\alpha$ -Amanitin (Spuren Amanitin und IFN / Ama). Die extrahierte RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. DIG-markierte POMP antisense RNA wurde als Sonde verwendet. Als Ladekontrolle wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte 28S rRNA verwendet. Die Bezeichnungen der Spuren richten sich nach der Behandlung der Zellen.

In Abb. 10 wird der Einfluss Interferon  $\gamma$  auf POMP-S verdeutlicht. Die Interferon  $\gamma$ -Induktion der mRNA ließ sich nicht durch den Transkriptions-Hemmer  $\alpha$ -Amanitin blockieren. Es wurde also hier nicht die Transkriptionsinitiationsrate erhöht, sondern die POMP-S-mRNA wurde stabilisiert. Als Kontrolle konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Amanitin die Menge an Transkript ohne zusätzliche Stimulation durch Interferon  $\gamma$  tatsächlich reduziert (s. Spur: Amanitin in Abb. 10).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die POMP Expression durch Interferon  $\gamma$  stimuliert wird. Dies konnte mittels Northern Blot-Analysen nachgewiesen werden (Burri, et al., 2000; Witt, et al., 2000). Luciferase Reporter-Gen-Assays zeigten, dass diese Induktion nicht auf die Aktivität des Promotors zurückzuführen ist. Die beiden mRNA-Varianten POMP-L und POMP-S sind zwei unterschiedliche Transkripte von POMP, die sich nur in der Länge ihrer 3'-UTR unterscheiden. POMP-L wurde mittels Luciferase Reporter-Gen-Analysen untersucht. Es konnten keine Effekte nach Interferon  $\gamma$ -Stimulation festgestellt werden. Daher wurde die Stabilität der POMP-S-mRNA im Northern Blot unter Einfluss von Interferon  $\gamma$  analysiert. In diesen Experimenten konnte die Stabilität dieser mRNA nachgewiesen werden. Demnach ist die Ursache der Erhöhung der mRNA Menge auf posttranskriptionelle Ereignisse von POMP-S zurückzuführen.

## 3.2 Konzertierte Transkript-Induktion proteasomaler Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren

Über die Gen-Regulation der proteasomalen Untereinheiten ist noch wenig bekannt. Es wurden schon mehrere Hinweise auf eine Regulation des Proteasoms beobachtet. So entdeckten Wojcik und DeMartino (2001), dass ein *knock down* von proteasomalen Untereinheiten durch RNA *interference* zu einer Hochregulation der nicht betroffenen Untereinheiten führt (Wojcik and DeMartino, 2001). In Rattenmuskeln wurde bei Diabetes eine höhere mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten  $\alpha 2$ (C3),  $\alpha 3$ (C9) und  $\beta 6$ (C5) gefunden (Price, et al., 1996). Außerdem induzieren synthetische Glucocorticoide proteasomale Untereinheiten wie  $\alpha 2$ (C3), während NF- $\kappa$ B die Untereinheit herunterreguliert (Du, et al., 2000). Aufgrund dieser Anhaltspunkte ist es wahrscheinlich, dass ein Regulationsmechanismus für das Proteasom existiert. Dieser sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden.

### 3.2.1 Analyse der Genexpression durch *real time* RT-PCR

Meiners *et al.* entdeckten einen ersten Zusammenhang zwischen Inhibition des Proteasoms und der daraus resultierenden Hochregulation proteasomaler Untereinheiten mit kommerziell erhältlichen cDNA *microarray*. Diese wurde in Abhängigkeit von Proteasom-Inhibition mit *clasto*-Lactacystin und MG132 bei den proteasomalen Genen  $\alpha 2$ (PSMA2),  $\alpha 4$ (PSMA7),  $\alpha 6$  (PSMA1),  $\beta 1$ (PSMB6),  $\beta 3$ (PSMB3),  $\beta 4$ (PSMB2) und  $\beta 7$ (PSMB4) ermittelt und durch *Real time* RT-PCR bestätigt. In Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe sollte die Induktion der Untereinheiten genauer charakterisiert werden. Dazu wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (VSMC, *vascular smooth muscle cells*) für jeweils 6 Stunden mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin, 10  $\mu$ M MG132 oder 0,1 % DMSO als Kontrolle behandelt.

Tab. 2: **Real time RT-PCR Analyse der Expression proteasomaler Gene nach Proteasom-Inhibitorbehandlung**

Ratten VSMCs wurden für 6 h mit 10 µM clasto-Lactacystin, 10 µM MG132 oder 0,1 % DMSO versetzt und die Expression der angegebenen proteasomalen Gene mittels *real time* RT-PCR analysiert. Die Werte beziehen sich auf die relative RNA-Expression von Zellen, die mit Proteasom-Inhibitor behandelten wurden, gegenüber DMSO behandelte Kontrollzellen ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ). Es wurde die Gennamen-Nomenklatur verwendet. Durchgeführt von Meiners *et al.*

| Gen / Untereinheit  | Relative RNA Expression    |                 |
|---------------------|----------------------------|-----------------|
|                     | <i>clasto</i> -Lactacystin | MG132           |
| PSMA1 (α6 / C2)     | 3,8                        | 3,4             |
| PSMA2 (α2 / C3)     | 1,8                        | 1,8             |
| PSMA3 (α7 / C8)     | 2,4                        | 2,5             |
| PSMA4 (α3 / C9)     | 2,4                        | 1,8 <b>α-UE</b> |
| PSMA5 (α5 / zeta)   | 4,0                        | 3,9             |
| PSMA6 (α1 / iota)   | 2,1                        | 1,3             |
| PSMA7 (α4 / XAPC7)  | 3,6                        | 2,5             |
| PSMB1 (β6 / C5)     | 1,8                        | 1,9             |
| PSMB2 (β4 / C7-1)   | 2,8                        | 2,4             |
| PSMB3 (β3 / C10)    | 3,1                        | 3,4             |
| PSMB4 (β7 / N3)     | 2,3                        | 2,9 <b>β-UE</b> |
| PSMB5 (β5 / Mb1)    | 1,5                        | 1,5             |
| PSMB6 (β1 / δ)      | 2,5                        | 2,6             |
| PSMB7 (β2 / Z)      | 2,3                        | 2,6             |
| PSMB8 (β5i / LMP7)  | 0,5                        | 0,5             |
| PSMB9 (β1i / LMP2)  | 1,2                        | 1,2             |
| PSMC1 (Rpt2 / S4)   | 2,1                        | 1,3             |
| PSMC2 (Rpt1 / S7)   | 2,1                        | 1,9             |
| PSMC3 (Rpt5 / S6a)  | 2,2                        | 2,1             |
| PSMC4 (Rpt3 / S6b)  | 2,9                        | 2,7             |
| PSMC5 (Rpt6 / S8)   | 3,3                        | 2,2             |
| PSMC6 (Rpt4 / S10b) | 2,1                        | 2,3 <b>19S</b>  |
| PSMD1 (Rpn2 / S1)   | 2,4                        | 1,6             |
| PSMD3 (Rpn3 / S3)   | 3,6                        | 3,7             |
| PSMD4 (Rpn10 / S5a) | 1,3                        | 1,6             |
| PSMD8 (Rpn12 / S14) | 2,3                        | 1,7             |

## ERGEBNISSE

|                      |     |     |
|----------------------|-----|-----|
| PSMD9 (Rpn12 / S15)  | 1,6 | 1,0 |
| PSMD10 (Rpn12 / p28) | 0,4 | 0,3 |
| PSMD11 (Rpn6 / S9)   | 3   | 1,3 |
| PSMD13 (Rpn13 / S11) | 1,5 | 1,5 |

Meiners *et al.* 2003

Die Tab. 2 zeigt die Veränderung der relativen mRNA-Menge unter Inhibitor-Einfluss im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die konstitutiven Untereinheiten des 20S Proteasoms (PSMA1-PSMB7) wurden 1,5 bis 4fach induziert. Die Höhe der Induktion von *clasto*-Lactacystin und MG132 war vergleichbar. So wurde PSMA5 ( $\alpha$ 5) durch *clasto*-Lactacystin 4fach induziert und mit MG132 3,9fach, während PSMA6 ( $\alpha$ 1) 2,1fach durch *clasto*-Lactacystin aber nur 1,3fach durch MG132 induziert wurde. Generell werden aber sowohl alle konstitutiven 20S Untereinheiten als auch die für ATPase-Untereinheiten kodierenden Gene PSMC1 - PSMC6 hochreguliert. Bei den Nicht-ATPase-Untereinheiten ist diese gemeinsame Induktion nicht zu erkennen, wie ein Vergleich der Untereinheit PSMD3 (Rpn3) und PSMD10 (Rpn12) verdeutlicht. PSMD10 (Rpn12) wird unter Inhibitor-Einfluss deutlich geringer als die Kontrolle induziert, während PSMD3 (Rpn3) eine 3,6 - 3,7fache Hochregulation aufweist. Die Immunountereinheiten PSMB8 (LMP7) und PSMB9 (LMP2) wurden entweder herunterreguliert oder nur sehr mäßig induziert, was eine komplett unabhängige Regulationskontrolle für die Immunountereinheiten vermuten lässt.

Tab. 2 verdeutlicht, dass die Zelle auf Inhibition des Proteasoms mit konzertierter Induktion der proteasomalen mRNAs reagiert.

### 3.2.2 Die Induktion auf transkriptioneller Ebene

Die Ergebnisse der *real time* RT-PCR dienten dazu, einen Einblick in die Regulation der Genexpression des Mammalia-Proteasoms zu erhalten. Zum ersten Mal hatte man eine gemeinsame Induktion von proteasomalen Untereinheiten als Reaktion auf einen äußeren Reiz erkennen können, so dass eine gemeinschaftliche Regulation nahe liegt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden exemplarisch für das Proteasom drei Untereinheiten und der Maturierungsfaktor POMP für die nachfolgenden Experimente ausge-

wählt. Es wurden jeweils Antikörper oder Sonden von einer Untereinheit des 19S Regulators, Rpt1(S7), dem Maturierungsprotein POMP, einer  $\alpha$  - Untereinheit  $\alpha 6(C2)$  und einer  $\beta$ -Untereinheit,  $\beta 1(\delta)$  verwendet. POMP wurde als Marker für die Biogenese des Proteasoms ausgewählt, die zusätzlich auch durch die  $\beta 1(\delta)$ -Proform analysiert werden kann.

Um die Expression auf transkriptioneller Ebene zu überprüfen, wurde die mRNA-Menge der ausgewählten Gene nach Zugabe von Inhibitor analysiert. Dazu wurden VSMC wahlweise für 6 h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin, 10  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M unspezifischen Calpain-Inhibitor ALLM oder 0,1 % DMSO behandelt. Mit der extrahierten RNA wurde mittels Northern-Hybridisierung exemplarisch Rpt1(S7) mRNA nachgewiesen (s. Abb. 11). Rpt1(S7) wurde als Beispiel in den Northern Blot-Analysen verwendet, da diese ATPase-Untereinheit durchschnittliche Induktionswerte in der *Real-time* RT-PCR in Tab. 2 aufwies und der Northern Blot für diese Untereinheit etabliert war. Weitere Beispiele für Northern Blot-Analysen wurden von Meiners *et al.* veröffentlicht (Meiners, et al., 2003).

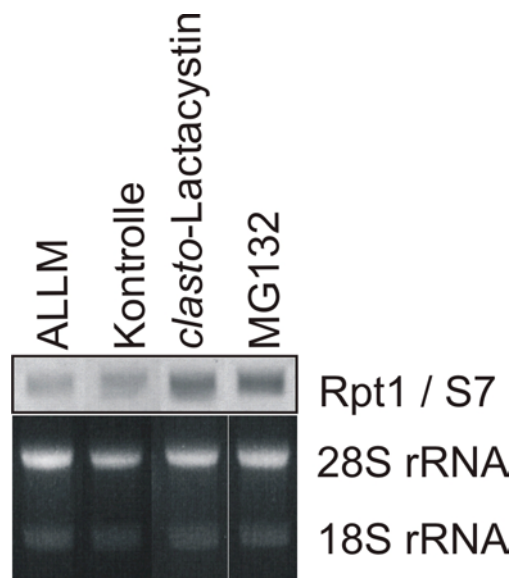
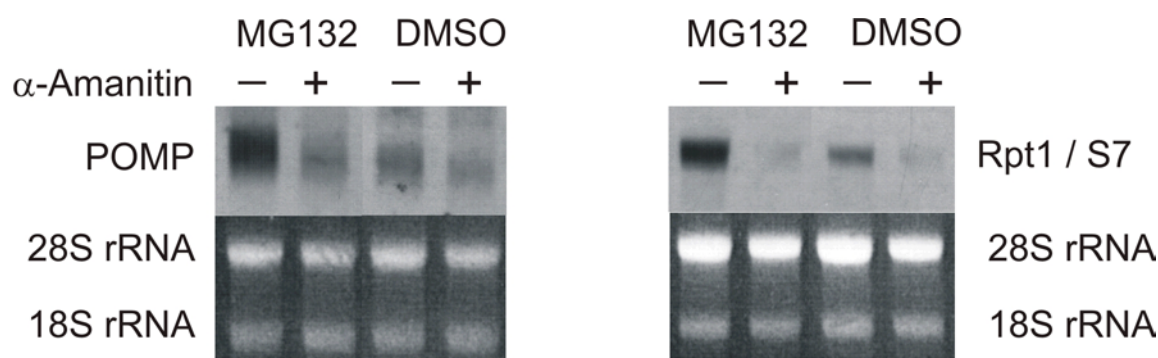


Abb. 11: **Stimulation der RPT1(S7)-mRNA durch Proteasom-Inhibitoren**  
 Northern Blot: VSMCs wurden für 6 h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin (Spur: c-Lacta), 10  $\mu$ M MG132 (Spur: Mg132), 10  $\mu$ M ALLM (Spur: ALLM) oder 0,1 % DMSO (Spur: Kontrolle) behandelt. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die geblottete RNA wurde dann mit DIG-markierter RNA-Sonde gegen Rpt1(S7) detektiert. Als Ladekontrolle diente die Ethidumbromid gefärbte rRNA.

Abb. 11 verdeutlicht, dass die Menge an Rpt1 (S7) mRNA in den beiden Kontrollspuren

ALLM und Kontrolle nahezu identisch waren, während in den Spuren der mit Proteasom-Inhibitor behandelten Zellen die mRNA-Menge deutlich erhöht war. Die moderate 2,1fache Induktion von Rpt1(S7) der *Real time* RT-PCR (Tab. 2) konnte also auch im Northern Blot experimentell visualisiert werden.

Die Menge an mRNA kann entweder durch erhöhte Syntheserate oder durch verminderten Abbau der mRNA gesteigert werden. Um zu überprüfen, ob die Induktion nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitor auf posttranskriptionelle Ereignisse zurückzuführen ist, wurden die VSMC nach 6h Inkubation mit MG132 für 16 h mit RNA Polymerase II-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin versetzt. Bei einem stabilen Transkript sollte sich die Menge an mRNA nach Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin nicht verändern. Nach der Behandlung wurde die RNA präpariert und mittels Northern-Hybridisierung mit spezifischen Sonden Rpt1(S7) und POMP detektiert (s. Abb. 12).



**Abb. 12: Induktion der mRNA von POMP und Rpt1(S7) nach Proteasom-Inhibitorbehandlung ist nicht auf eine Stabilisierung zurückzuführen**

Northern Blot: VSMCs wurden für 6 h mit 10  $\mu$ M MG132 (Spur: MG132) oder 0,1 % DMSO (Spur: Kontrolle) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 16 h mit 10  $\mu$ g / ml  $\alpha$ -Amanitin versetzt (+). Die extrahierte RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran transferiert. Die geblottete RNA wurde mit DIG-markierten RNA-Sonden gegen Rpt1(S7) und POMP detektiert. Als Ladekontrolle diente die Ethidumbromid angefärbte rRNA.

Das Signal nahm für beide mRNA's im Falle von MG132 nach  $\alpha$ -Amanitin Zugabe ab. Es ist davon auszugehen, dass die mRNA nicht stabilisiert wurde, sondern die Induktion auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen ist.

### 3.2.3 Induktion auf Proteinebene

Um zu zeigen, dass die mRNA-Induktion auch zu einer gesteigerten Translation führt, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden VSMC 8 Stunden mit je 10  $\mu$ M der Proteasom-Inhibitoren c-Lactacystin oder MG132 inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO und der unspezifische Calpain-Inhibitor ALLM verwendet. Die Proteine wurden mit Rpt1(S7),  $\alpha$ 6(C2) und  $\beta$ 1( $\delta$ ) spezifischen Antiseren nachgewiesen (s. Abb. 13a). Die Wirksamkeit der proteasomalen Inhibitoren wurde durch den signifikanten Anstieg von ubiquitinierten Proteinen und HSP70 im Western Blot mit Zelllysate nachgewiesen. Ubiquitin und HSP70 werden nach Inhibition des Proteasoms entweder angestaut oder induziert, daher sind diese beiden Proteine als Marker für die Inhibition gut geeignet (Bush, et al., 1997; Kim, et al., 1999). Eine Hemmung des Proteasoms konnte zusätzlich durch die Messung der Chymotrypsin-ähnlichen proteolytischen Aktivität des Proteasoms im Zellextrakt gezeigt werden (s. Abb. 13b).

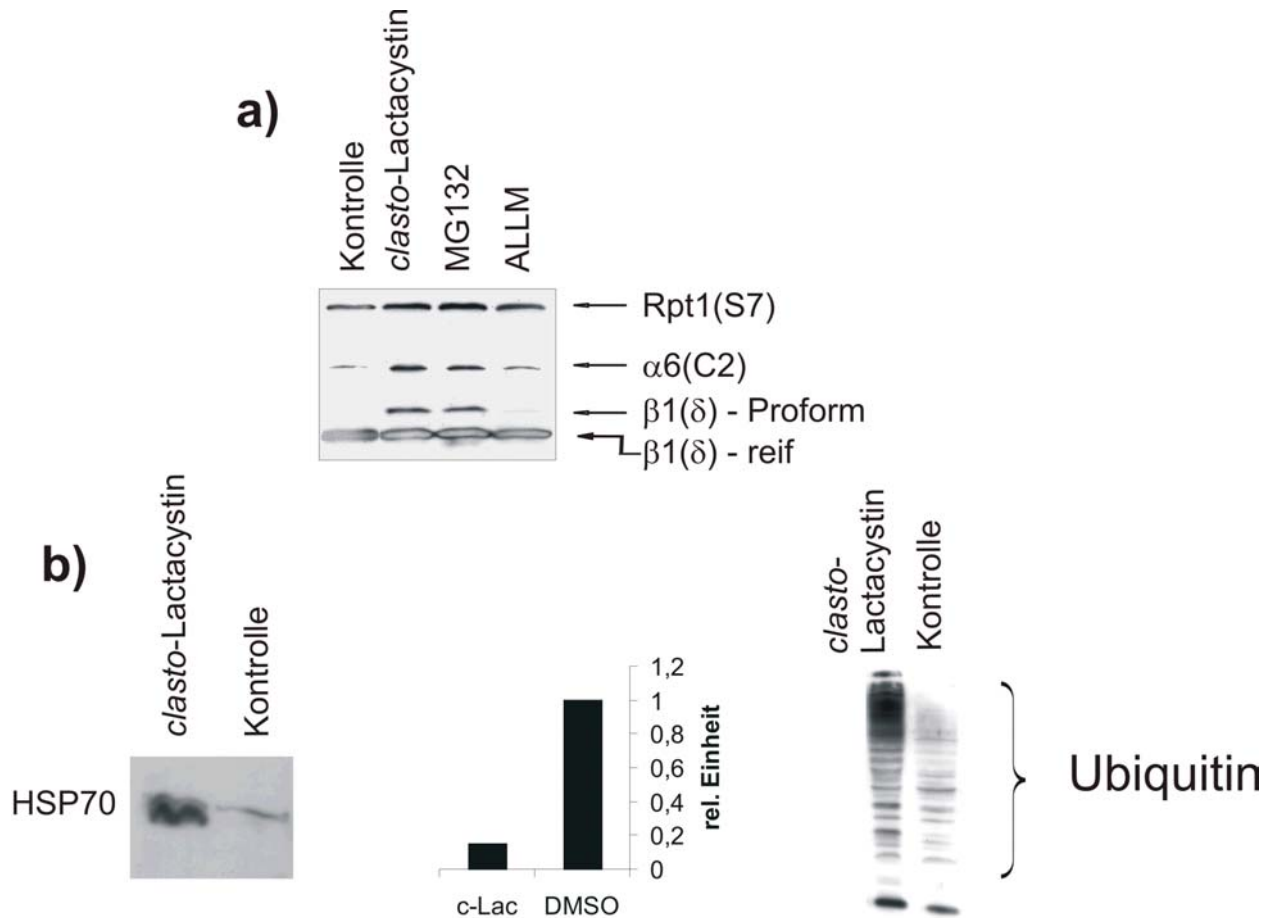


Abb. 13: **Stimulation auf Proteinebene**

Western Blot: VSMC wurden für 8h mit Inhibitoren behandelt und die Zellysate wurden im PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Western Blot-Analyse.

a) jeweils 10  $\mu$ M clasto-Lactacystin (c-Lacta); 10  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M ALLM oder 0,1 % DMSO (Kontrolle), detektiert mit angegebenen Antikörpern.

b) Kontrolle der Inhibition des Proteasoms durch Western Blot-Analysen von Ubiquitin-Konjugaten und HSP70. Chymotrypsin-ähnlicher Aktivitätstest wurde an Zellysat durchgeführt.

In Abb. 13 ist der Induktions-Effekt bei Inhibitor-Zugabe auch auf Proteinebene zu erkennen. Rpt1(S7),  $\alpha 6(C2)$  und  $\beta 1(\delta)$  werden bei Inhibitor-Zugabe eindeutig stärker exprimiert als bei den Kontrollen. Für die  $\beta$ -Untereinheit  $\beta 1(\delta)$  ist die verstärkte Synthese hauptsächlich auf der Zunahme der Menge an Proprotein zurückzuführen.

Als Folge der Inhibition des Proteasoms wurde nicht nur die mRNA, sondern auch die Menge an Protein erhöht. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition des Proteasoms und der damit verbundene Anstieg der proteasomalen Untereinheiten auf Proteinebene nicht Folge einer Proteinakkumulation durch fehlenden Abbau ist sondern auf Neusynthese des Proteasoms beruht. Um diese *de novo* Synthese des Proteasoms nachzu-



weisen, wurden VSMC mit den Inhibitoren behandelt und anschließend metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Mit einem 20S-Antikörper wurde das 20S Proteasom präzipitiert und in einer denaturierenden PAGE nach Größe getrennt (s. Abb. 14).

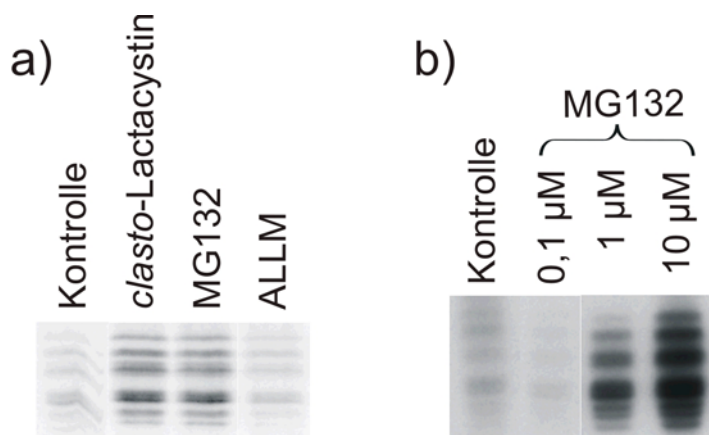


Abb. 14: **de novo Synthese von Proteasom nach Proteasom-Inhibitorbehandlung**

Immunpräzipitation des 20S Proteasom aus mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Zellen mit einem Antikörper gegen 20S Proteasom (K08)

a) VSMC wurden jeweils für 8h mit 10  $\mu\text{M}$  clasto-Lactacystin ; 10  $\mu\text{M}$  MG132, 10  $\mu\text{M}$  ALLM oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) behandelt und anschließend für 16h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert. Aus dem markierten Zelllysate wurde 20S Proteasom mit einem Antikörper gegen das 20S Proteasom immunpräzipitiert. Es wurden identische Mengen des  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Zelllysates in SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Signale detektiert.

b) Konzentrationsreihe MG132: VSMC wurden jeweils für 8h mit den angegebenen Konzentrationen von MG132 oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) behandelt und anschließend für 16h mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert. Aus dem markierten Zelllysate wurde 20S Proteasom mit einem Antikörper gegen das 20S Proteasom immunpräzipitiert. Es wurden identische Mengen des  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierter Zelllysates in SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Signale detektiert.

In Abb. 14 sind die autoradiographisch detektierten Banden des präzipitierten Proteasoms zu sehen. Es zeigt das typische Proteasom-Bandenmuster, welches in einer Größe zwischen 22 und 32 kDa in einer SDS-PAGE migriert. Es ist ein deutlicher Anstieg der Signalintensität der mit Proteasom-Inhibitor behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Zellen auf Verlust der proteasomalen Aktivität durch Proteasom-Inhibition mit einer *de novo* Synthese der proteasomalen Untereinheiten reagieren. Diese gesteigerte Expression ist von der Konzentration des Inhibitors abhängig, wie in Abb. 14b gezeigt.

### 3.2.4 Beeinflussung der POMP Expression und der Proteasom Biogenese durch Inhibition des Proteasoms

Proteasom-Inhibitoren induzieren folglich eine erhöhte Translation von proteasomalen Untereinheiten. Diese Neusynthese von proteasomalen Untereinheiten führt vermutlich über den Biogeneseweg zu reifem 20S Proteasom. Diese Vermutung wird gestützt von der Tatsache, dass vermehrt 20S Proteasom aus metabolisch markierten Zelllysaten präzipitiert werden konnte, von Zellen die vorher mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden. Reifes 20S Proteasom wird nur über den Biogeneseweg neu gebildet. Die Situation des 26S Proteasoms wird in nachfolgenden Experimenten aufgeklärt. Zunächst wurde der Biogeneseweg untersucht.

Um die Ergebnisse der Immunpräzipitation zu verifizieren und die Biogenese des Proteasoms näher zu analysieren, wurde das Maturierungsprotein POMP untersucht. Dazu wurden VSMC Zellen für die Northern Blot-Analysen 6 h oder für die Western Blot-Analysen 8 h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin, 10  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M des unspezifischen Inhibitors ALLM oder 0,1 % der Negativkontrolle DMSO behandelt. Es zeigte sich, dass POMP sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene durch die Zugabe von MG132 und *clasto*-Lactacystin hochreguliert wird (s.

Abb. 15).

POMP ist bekannt als Assemblierungsfaktor, der als erstes Substrat des Proteasoms abgebaut wird. Dieses Protein begleitet den Biogeneseweg des Proteasoms und ist Teil des Precursor-Komplexes. Ausgehend von der Annahme, dass das Proteasom durch *de novo* Synthese mit vollständiger Biogenese nach Inhibitorbehandlung neu gebildet wird, müsste POMP als Assemblierungsfaktor verstärkt in den *Precursor*-Komplexen zu finden sein.

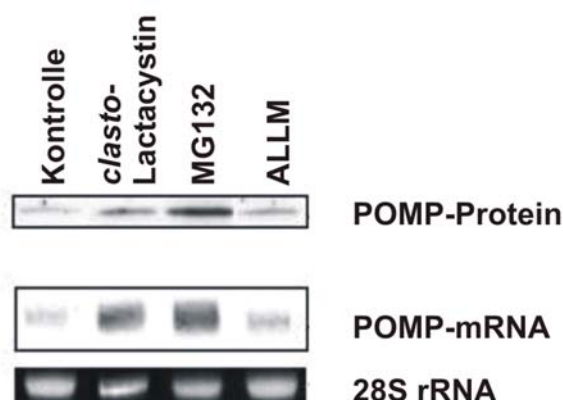


Abb. 15: **Induktion von POMP durch Proteasom-Inhibitoren auf mRNA- und Protein-**  
**ebene**

Western Blot und Northern Blot: VSMCs wurden für die Northern Blot-Analysen 6 h und für die Western Blot-Analysen 8 h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin (Spur: c-Lacta), 10  $\mu$ M MG132 (Spur: Mg132), 10  $\mu$ M ALLM (Spur: ALLM) oder 0,1 % DMSO (Spur: Kontrolle) behandelt. Das Zelllysat wurde für den Western Blot im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern POMP detektiert. Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mittels DIG-markierter RNA-Sonde detektiert. Als Ladekontrolle für den Northern Blot diente die mit Ethidiumbromid gefärbte 28S rRNA. Sowohl die Proteinmenge, als auch die mRNA-Menge ist deutlich erhöht in den Spuren der mit Proteasom-Inhibitor behandelten Zellen.

In 20S Proteasom-Komplexen ist POMP nicht zu detektieren, da POMP durch das reife 20S Proteasom abgebaut wird. Daher wurden *Precursor*-Komplexe aus VSMC-Zelllysat immunpräzipitiert, welches aus Zellen stammt, die 6h mit Proteasom-Inhibitoren behandelten wurden und metabolisch radioaktiv markiert wurden (s. Abb. 16). Die Präzipitation wurde mit dem Antikörper C8 durchgeführt, der spezifisch *Precursor*-Konformationen erkennt (Antikörper aus (Nandi, et al., 1997). Aus den mit *clasto*-Lactacystin und MG132 behandelten Zellen wurden im Vergleich zu den Kontrollen, die mit DMSO und ALLM behandelt wurden, sowohl signifikant mehr POMP, als auch Proteasom *Precursor*-Komplexe präzipitiert.

Proteasom-Inhibition führt zu einer Zunahme der mRNA und des Proteins von POMP. Darüber hinaus konnte nach Inhibition des Proteasoms vermehrt mit POMP assoziierte *Precursor*-Komplexe immunpräzipitiert werden. Vermutlich kommt es tatsächlich zu einer gesteigerten Biogenese, was nach dem Nachweis einer größeren Menge an Pre-

cursor-Komplexen, verursacht durch die Inhibition des Proteasoms, wahrscheinlich wird. Dies sollte durch weitere Experimente belegt werden, welche die Biogenese des Proteasoms unter Inhibitoreinfluss zeigen.

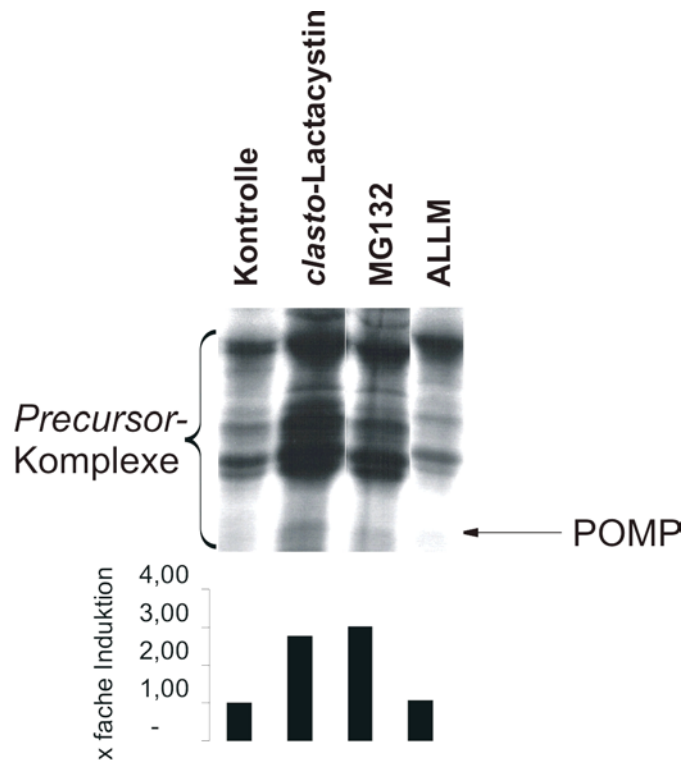


Abb. 16: **Induktion von POMP und Proteasom *Precursor*-Komplexen nach Proteasom-Inhibitorbehandlung**

VSMC wurden jeweils für 8h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin (c-Lacta); 10  $\mu$ M MG132, 10  $\mu$ M ALLM oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) behandelt und anschließend für 16h mit  $^{35}$ S-Methionin markiert. Aus dem markierten Zelllysate wurden *Precursor*-Komplexe mit C8-Antikörper immunpräzipitiert und identische Mengen an radioaktivem Zelllysate durch SDS-PAGE getrennt und die radioaktiven Signale detektiert. Die POMP-Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet und wurde densitometrisch gemessen (s. Diagramm). Die Balken geben die relative Menge an POMP im Vergleich zu der Kontrolle an.

In den verschiedenen Stadien der Biogenese des Proteasoms entstehen Zwischenstadien unterschiedlicher Größe. Um die Verteilung dieser Zwischenstadien nachzuweisen ist eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt worden. Proteine und Komplexe trennen sich nach ihrer Größe und lassen sich dadurch besonders gut unterscheiden. Dies würde Aussagen über die verschiedenen Stadien der Proteasom-Biogenese zulassen, die sich durch unterschiedlich große Komplexe charakterisieren lassen. Dazu wurden VSMC für 8h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin oder 0,1 % DMSO behandelt. Von

den Zellen wurde Gesamtzelllysat präpariert und gleiche Proteinmengen in einer Dichtegradientenzentrifugation getrennt und fraktioniert. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen im Western Blot mit spezifischen Antiseren gegen Rpt1(S7),  $\beta 1(\delta)$ , POMP und gegen das 20S Proteasom analysiert (s. Abb. 17).

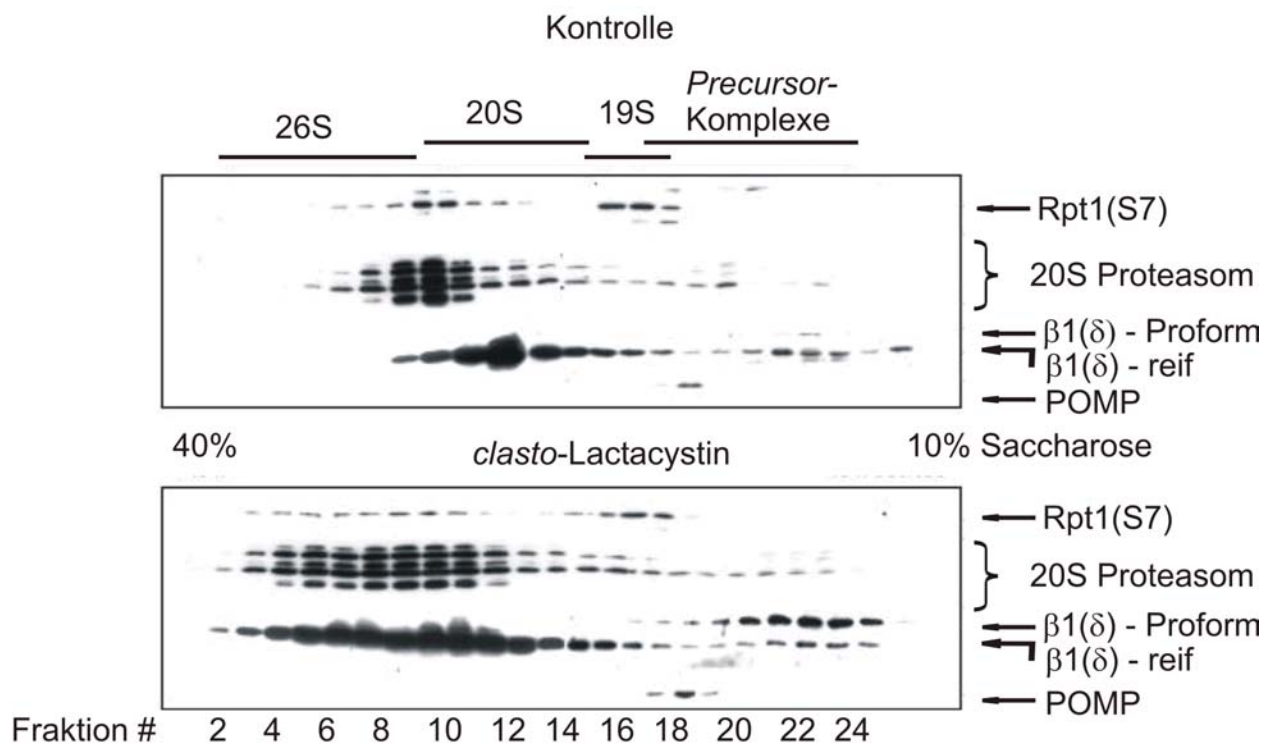


Abb. 17: **Gesteigerte Expression proteasomaler Untereinheiten und POMP nach Proteasom-Inhibitorbehandlung**

Saccharose-Dichtegradient: VSMC wurden für 8 h mit 10  $\mu$ M *clasto*-Lactacystin oder 0,1 % DMSO behandelt. Das Zelllysat wurde über einen Dichtegradienten sedimentiert und fraktioniert (beginnend bei 40% Saccharosekonzentration). Gleiche Volumina der Fraktionen wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen 20S Proteasom (Proteasom),  $\beta 1(\delta)$  und POMP detektiert. Die Pfeile markieren die Signale der Proteine. Die Fraktionen in denen üblicherweise 26S, 20S und *Precursor* Proteasom migrieren, sind markiert. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Menge an *Precursor*-Proteasom als auch 20S und 26S Proteasom zu erkennen. Mit Proteasom-Inhibitor wurde die Expression der proteasomalen Untereinheiten stimuliert.

Die proteasomale Verteilung in einem Saccharosegradienten ist in Abb. 17 dargestellt. In den Fraktionen höherer Dichte (#3-9) findet man große Komplexe wie das 26S Proteasom. Hier waren auch Signale der „reifen“ proteasomalen Untereinheiten zu detektieren. Der 20S Komplex findet sich in den Fraktionen 10-13 wieder. Die Fraktionen ge-

ringerer Dichte führen somit kleinere Komplexe wie die *Precursor*-Komplexe bis hin zu den freien Untereinheiten.

In den Fraktionen 16-23 sind deutliche Unterschiede der  $\beta 1(\delta)$  Signale zu erkennen. Es ist im Unterschied zur DMSO Kontrolle deutlich mehr  $\beta 1(\delta)$ -Proform detektierbar (# 16-23). Außerdem wurde mehr POMP in diesen Fraktionen nachgewiesen. Das Signal der reifen Proteasom-Untereinheiten sowie 20S Proteasom und Rpt1(S7) war bei Zugabe von *clasto*-Lactacystin verstärkt in den hochmolekularen Fraktionen des Gradienten zu bestimmen. Dies lässt vermuten, dass mehr 26S Proteasom in den Zellen vorhanden war.

Zusammenfassend führt Proteasom-Inhibition zu einer vermehrten *de novo* Synthese von POMP und von Proteasom-*Precursor*-Komplexen. Dies wurde durch metabolische Markierung von neu synthetisierten Proteinen gezeigt. Dieser *Precursor*-Anstieg mündet in einer gesteigerten Proteasom-Biogenese mit einer signifikant größeren Menge an 20S und 26S Proteasom.

### 3.2.5 $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Analysen durch Reportergenfusion

In Hefe werden alle proteasomalen Untereinheiten durch den Transkriptionsfaktor Rpn4 reguliert (Mannhaupt, et al., 1999). Dieser Faktor wird proteasomal abgebaut, so dass die Menge an exprimiertem Proteasom durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus steuerbar ist (Xie and Varshavsky, 2001). Ein solcher Mechanismus könnte durchaus auch bei Mammalia von Bedeutung sein, da die mRNA nicht stabilisiert wird. Es konnte bisher allerdings weder ein PACE-Element noch ein dem Rpn4 homologes Protein gefunden werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass einer oder mehrere Faktoren die Steuerung der Expression beeinflussen könnten.

$\beta 1(\delta)$  zeigt eine durchschnittlich 2,5fache Induktion der Genexpression als Antwort auf Hemmung des Proteasoms und wurde deshalb für Promotorstudien ausgewählt. Die Auswahl eines Gens, welches zu weit vom Durchschnitt abweicht wurde nicht verwendet, da nach einem Regulationsmechanismus für das gesamte Proteasom gesucht wird.

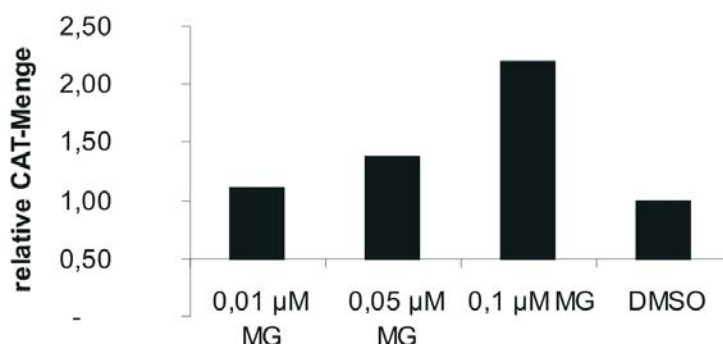
Grundlage für das Primerdesign war der genomische NCBI-Datenbankeintrag mit der

*Accession* Nummer AC027820. Zur Gewinnung der regulatorischen Region des  $\beta 1(\delta)$ -Gens wurde 1,5 kb in 5' Richtung (gerechnet vom Transkriptionsstartpunkt) aus der genomischen DNA von HeLa Zellen amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) ligiert. Das Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *XhoI* behandelt und mit dem Vektor pCAT3basic (Promega) fusioniert. Der Vektor trägt Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) als Reportergen, welches durch einen ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) detektiert werden kann. Der Grund für die Verwendung des CAT-Systems anstelle der Luciferase ist deren Sensitivität gegen Proteasom-Inhibitoren (Deroo and Archer, 2002). Die Aktivität der Luciferase wird durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt, so dass dieses System für die Zwecke dieser Arbeit nicht zu verwenden ist. Zunächst wurde die Promotor-Aktivität in HeLa-Zellen nachgewiesen. Durch die gesteigerte CAT-Menge im Vergleich zur Kontrolle konnte eindeutig eine Promotor-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Für die angestrebte Analyse waren HeLa-Zellen nicht geeignet, da schnell wachsende Krebszelllinien nicht den Effekt der Induzierbarkeit von proteasomalen Untereinheiten zeigen konnten (Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe). Die verwendete immortalisierte HUVEC-Zelllinie (Edgell, et al., 1983) ist ebenfalls eine permanente Zelllinie, besitzt aber die gleichen langsamen Wachstumseigenschaften, wie eine primäre Zelllinie und ist daher besser für die Experimente geeignet.

HUVEC Zellen wurden mit dem 1,5 kb großen Promotor-Konstrukt transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen des Proteasom-Inhibitors MG132 behandelt. Es wurde nun nur der Inhibitor MG132 verwendet, da MG132 für das CAT-Reportergen-System schon beschrieben ist (Deroo and Archer, 2002). Der CAT-Reportergen-Assay läuft nach folgendem Prinzip: Das Gen der CAT ist in dem Vektor kodiert. Die multiple Klonierungsstelle liegt so, dass das eingefügte DNA-Fragment der CAT als Promotor dienen kann. Somit wird die CAT in Abhängigkeit des Promotors exprimiert und die CAT-Proteinmenge wird mittels des CAT-ELISA bestimmt. Die CAT-Menge ist mit der Aktivität des Promotors direkt korreliert. Das System wurde für den Promotorbereich von  $\beta 1(\delta)$  genutzt. Um die Promotor-Aktivität in Abhängigkeit der zugesetzten Konzentration des Proteasom-Inhibitors zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 0,1  $\mu\text{M}$  MG132 für 16 h etabliert. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  MG132 für 16 h

war die Aktivität am größten (s. Abb. 18).



**Abb. 18: Die gesteigerte Promotor-Aktivität nach Proteasom-Inhibitor Behandlung ist konzentrationsabhängig**

CAT-ELISA: HUVEC wurden mit dem 1,5 kb großen  $\beta 1(\delta)$ -Promotor Konstrukt transfiziert und für 16 h mit der angegebenen Konzentration an MG132 (MG) behandelt. Anschließend wurde die CAT-Menge im Photometer mit der Wellenlänge 405 nm gemessen und gegen die DMSO Kontrolle normiert. Die CAT-Menge stieg linear mit der Konzentration von MG132 an. Die größte Promotor-Aktivität konnte mit einer Konzentration von 0,1 µM MG132 gemessen werden.

Bei dieser Konzentration war die detektierte Menge der CAT mehr als doppelt so hoch als die der DMSO-Kontrolle. Hiermit konnte also gezeigt werden, dass Inhibitoren des Proteasoms einen Einfluss auf die Promotor-Aktivität der Untereinheit  $\beta 1(\delta)$  ausüben. Die Induktion des  $\beta 1(\delta)$ -Gens kann daher auf eine erhöhte Promotor-Aktivität zurückgeführt werden.

Der 1,5 kb große  $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Bereich muss Sequenzen enthalten, die als Bindestelle für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren dienen. Diese spielen wahrscheinlich bei der Genregulation durch Proteasom-Inhibitoren eine wichtige Rolle. Um die Region, in der die Bindungsstellen liegen, einzuschränken, wurde der 1,5 kb große  $\beta 1(\delta)$ -Promotor sukzessive verkürzt. Das 1,5 kb große Konstrukt wurde linarisiert und unter Ausnutzung der Exonuklease III-Aktivität verkürzte Promotoren erzeugt. Die entstandenen Verkürzungsklone sind in Abb. 19 zusammengefasst.

Die HUVEC-Zellen wurden mit den in Abb. 19 schematisch dargestellten Plasmiden transfiziert. Die CAT-Menge und damit die  $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Aktivität wurde nach 16 Stunden Inkubation mit 0,1 µM MG132 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen. Als Negativkontrolle diente der MECL-1-Promotor, der ebenfalls in den Vektor pCAT3basic kloniert wurde (s. MECL-1 in Abb. 19). Der MECL-1-Promotor wurde als



Kontrolle verwendet, da die Immunountereinheiten nicht durch Inhibition des Proteasoms induziert werden. Somit ist zu erwarten, dass der Promotor von MECL-1 nicht aktiviert wird. Es wurden  $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Fragmente mit den Größen 1500 bp, 400 bp, 200 bp, 130 bp, 100 bp und 40 bp in 5' Richtung des Gens eingesetzt (s. Abb. 19). Die CAT-Menge wurde jeweils in Zelllysaten gemessen, die aus MG132-behandelten (dunkler Balken) oder DMSO-behandelten (heller Balken) Zellen extrahiert wurden. Bei den Konstrukten von 1500 bp bis 130 bp Länge konnte eine stärkere Promotor-Aktivität der MG132-Proben im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) gemessen werden. Bei den kleineren Promotorfragmenten (100 und 40 bp) konnte keine Promotor-Aktivität mehr gemessen werden. Dies ist daran zu erkennen, dass die exprimierte CAT-Menge im Bereich der Negativkontrolle lag (s. Vektorkontrolle Abb. 19). Das bedeutet, dass innerhalb der 130 bp Sequenz eine oder mehrere Bindungsstellen für die regulatorischen Faktoren zu finden sind, da das 130 bp lange Sequenz des Promotors eindeutig induzierbar ist.

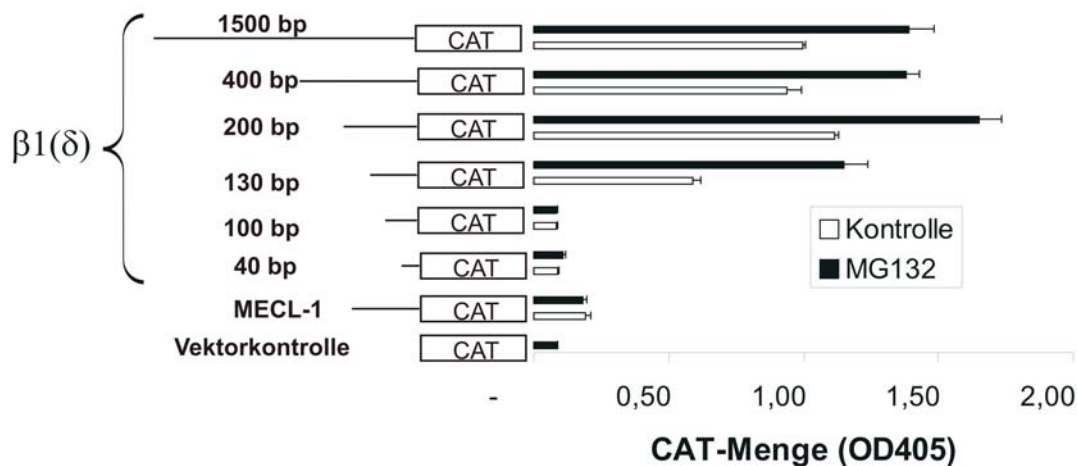


Abb. 19: **Untersuchung einzelner Abschnitte der Promotorregion des  $\beta 1(\delta)$ -Gens unter dem Einfluss von Proteasom-Inhibitor**

CAT-ELISA: HUVEC wurden mit den Exonuklease-Konstrukten angegebener Größe (vom Translationsstartpunkt aus gesehen) transfiziert. Die CAT-Menge wurde gemessen nach 16 h 0,1  $\mu$ M MG132 (weiße Balken) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle; dunkle Balken) Behandlung im Photometer bei 405nm. MECL-1-Promotor und Leervektor (CAT) dienten als Kontrolle.

Die MECL-1-Promotorkontrolle zeigte erwartungsgemäß keine Induktion bei MG132-Zugabe.

In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde ein so genanntes *Antioxidant Response Element* (ARE) in den Promotorregionen proteasomaler Untereinheiten der

Maus entdeckt (Kwak, et al., 2003). Nach oxidativem Stress bindet der Transkriptionsfaktor Nrf2 an das ARE der proteasomalen Untereinheiten. In einer hier durchgeführten Analyse konnte die Konsensus-Sequenz dieses Elementes auch im humanen  $\beta 1(\delta)$ -Promotorbereich gefunden werden. Damit ist ein potentieller Kandidat eines gemeinsamen Regulators der proteasomalen Genexpression gefunden.

### 3.2.6 Heat Shock Element und Antioxidanz Response Element

Für die nähere Untersuchung des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors wurde die Sequenz auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mittels des Programms TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=NBss>) untersucht (s. Abb. 20).

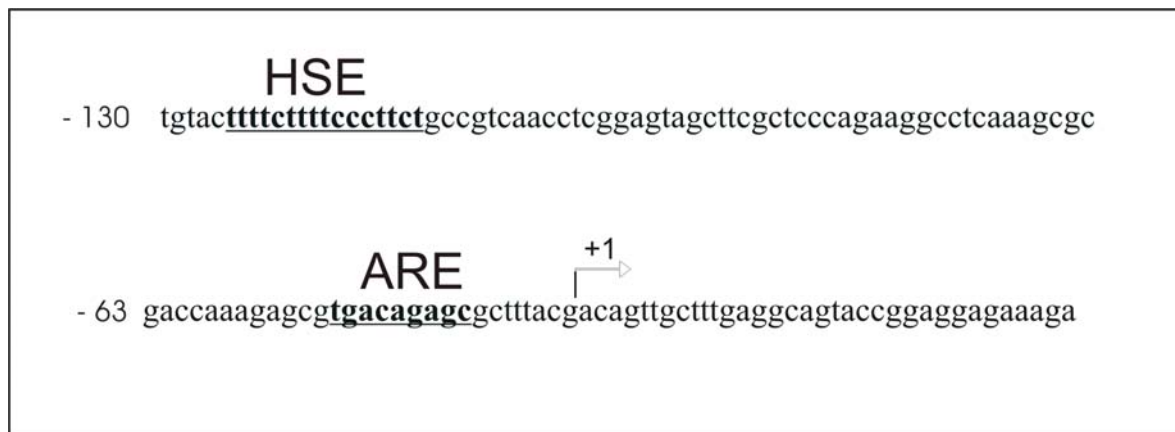


Abb. 20: **Räumliche Verteilung der putativen regulatorischen Elemente im 5' Bereich des  $\beta 1(\delta)$ - Gens**

Die Promotorsequenz von  $\beta 1(\delta)$  ist hier 130 bp vom Translationsstartpunkt aus angegeben. Die putativen Bindungsstellen *Heat Shock Element* (HSE) und *Antioxidant response element* (ARE) sind unterstrichen und in fetten Buchstaben hervorgehoben. +1 gibt den Transkriptionsstartpunkt an.

Putative Consensus Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren *Heat shock transcription factor 1* (HSTF1), der an HSE bindet und Nrf2, der mit ARE interagiert wurden festgestellt. Der Transkriptionsfaktor HSTF1 ist ein Hitzeschock-Transkriptionsfaktor, der auch bei proteasomaler Inhibition induziert wird und unter anderen das Hitzeschock Protein Hsp70 hochreguliert (Kawazoe, et al., 1998; Kim, et al., 1999; Lee and Goldberg, 1998). Nrf2 ist dafür bekannt, bei oxidativen Stress antioxidative Protein-Expression zu kontrollieren. Die möglichen Bindestelle für HSTF1, *Heat shock element* (HSE), liegt im Bereich zwischen 130 bp und 100 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt, während die Ziel-

sequenz für Nrf2 (TGACnnnGC; (Li and Jaiswal, 1992) 6 Basen vor dem Transkriptionsstartpunkt des  $\beta 1(\delta)$  Gens liegt (s. Abb. 20). Tab. 3 zeigt die Verteilung von den Elementen ARE und HSE in den 5' Regionen verschiedener proteasomaler Untereinheiten.

**Tab. 3: Vorkommen der Bindesequenzen HSE und ARE im 5' Bereich der angegebenen proteasomalen Gene**

Die Sequenz jeweils 1 kb in 5'-Richtung des Translationsstartpunkt der proteasomalen Gene wurde auf die Consensus-Sequenz der jeweiligen *cis-acting* Elemente untersucht. Die Anzahl der gefundenen übereinstimmenden Sequenzen wurde angegeben. Die Zahlen in Klammern geben den Abstand zum Translationsstartpunkt an.

| Proteasom Untereinheit         | ARE                | HSE      |
|--------------------------------|--------------------|----------|
| PSMA1 ( $\alpha 6$ / C2)       | -                  | -        |
| PSMA2 ( $\alpha 2$ / C3)       | 1x (-800)          | 1x (-70) |
| PSMA3 ( $\alpha 7$ / C8)       | 1x                 | -        |
| PSMA4 ( $\alpha 3$ / C9)       |                    |          |
| PSMA5 ( $\alpha 5$ / zeta)     | 1x(-500)           | -        |
| PSMA6 ( $\alpha 1$ / iota)     |                    |          |
| PSMA7 ( $\alpha 4$ / XAPC7)    | 3 x ; (1 x ca.-50) | -        |
| PSMB1 ( $\beta 6$ / C5)        | 1x (-800)          | -        |
| PSMB2 ( $\beta 4$ / C7-1)      |                    |          |
| PSMB3 ( $\beta 3$ / C10)       | 1x (-500)          | -        |
| PSMB4 ( $\beta 7$ / N3)        | 1x(-300)           | -        |
| PSMB5 ( $\beta 5$ / Mb1)       | -                  | -        |
| PSMB6 ( $\beta 1$ / $\delta$ ) | 1x (-30)           | 1x(-120) |
| PSMB7 ( $\beta 2$ / Z)         | 1 x ; (-800)       | -        |
| PSMC4 (Rpt3 / S6b)             | 1 x; (-300)        | -        |
| PSMC5 (Rpt6 / S8)              | -                  | -        |
| PSMD1 (Rpn2 / S1)              | 1 x: (-150)        | -        |
| PSMD3 (Rpn3 / S3)              | 2x                 | -        |
| PSMD11 (Rpn6 / S9)             | -                  | -        |

Zur näheren Analyse der putativen Bindungsstellen wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt. Je 20 bp lange *sense* und *antisense* Oligonukleotide mit den entsprechenden Zielsequenzen wurden miteinander hybridisiert und zu je 300 µM im EMSA eingesetzt. Die Oligonukleotide waren am 5' Ende mit dem Farbstoff Cyanin5 (Cy5) gekoppelt, so dass sie im Fluoroimager detektierbar waren. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit Kernextrakten aus den Zelllinien HUVEC und HeLa inkubiert und anschließend durch eine nicht denaturierende PAGE der Größe nach aufgetrennt. Oligonukleotide, die mit Kernproteinen komplexieren, migrieren in einem nativen PAA-Gel im höhermolekularen Bereich und lassen sich gut von den ungebundenen Oligonukleotiden trennen. Vor Isolation der Kernextrakte aus den Zellen, wurden diese mit MG132 oder DMSO behandelt. Waren die Banden der Komplexe aus Oligonukleotid und Protein nach Inhibitor-Behandlung stärker, konnte eine Aussage über das verstärkte Auftreten des entsprechenden Transkriptionsfaktors getroffen werden.

Im Falle des Oligonukleotids mit der Zielsequenz des ARE konnte man keine Unterschiede erkennen (s. Abb. 21).

Von beiden Transkriptionsfaktoren HSTF1 und Nrf2 ist bekannt, dass sie bei proteasomaler Inhibition induziert werden, so dass deren Proteinmenge als Kontrolle der proteasomalen Inhibition dienen kann (Itoh, et al., 2003; Kawazoe, et al., 1998; Kim, et al., 1999; McMahon, et al., 2003; Sekhar, et al., 2002; Stewart, et al., 2003). Die in Abb. 21b detektierten Signale der Proteine HSTF1 und Nrf2 sind nach der Behandlung deutlich hochreguliert. Die Inhibition des Proteasoms wurde dadurch indirekt nachgewiesen.

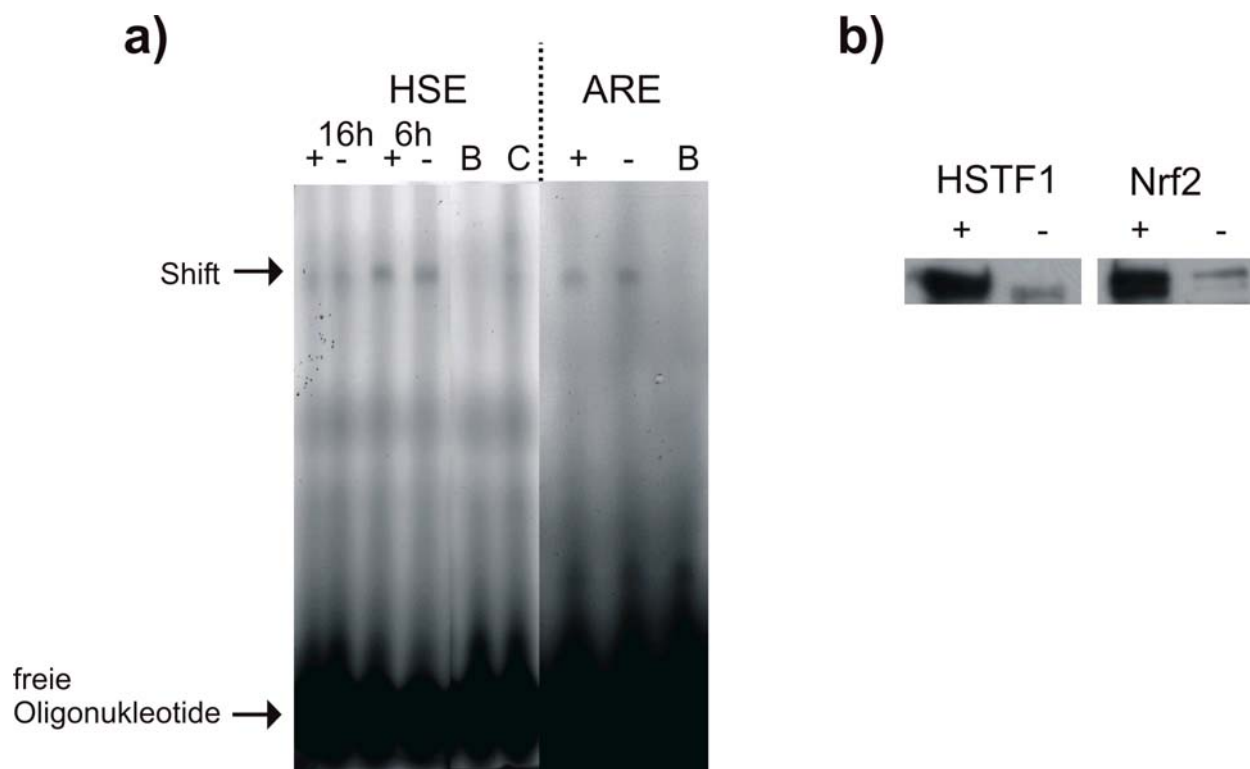


Abb. 21: **Bindung von Kernproteinen an die Elemente HSE und ARE**

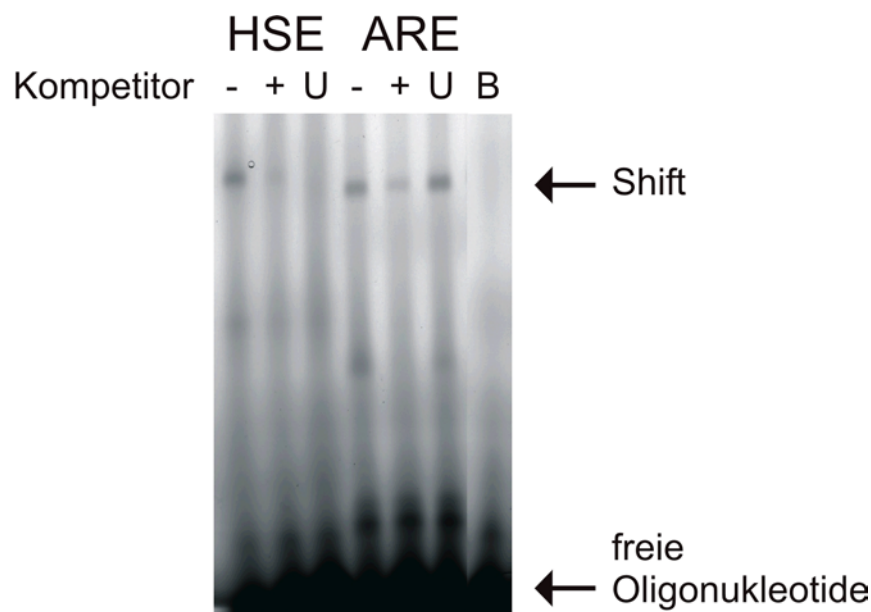
EMSA: HUVEC-Zellen wurden für 6 h oder 16h mit 1µM MG132 behandelt. Aus den Zellen wurden Kern- und cytoplasmatische- Proteine extrahiert. Anschließend wurden Cy5 markierte Oligonukleotide der  $\beta 1(\delta)$ -HSE bzw. ARE für 30 Minuten bei 25° C mit jeweils 10 µg Kernextrakt inkubiert. Darauf folgend wurde der Ansatz durch eine nicht denaturierende PAGE aufgetrennt. Die Signale von Cy5 wurden mit dem Fluoroimager detektiert.

a) Die Zellen wurden für 16 h oder 6 h mit 1 µM MG132 (+) oder mit 0,1 % DMSO (-) behandelt. B = BSA Kontrolle, statt Kernextrakt wurde 10 µg BSA verwendet; C= cytoplasmatisch, statt Kernextrakt wurde Cytoplasmaextrakt verwendet

b) Indirekte Kontrolle der Proteasom-Inhibition durch den Nachweis der Proteine HSTF1 und Nrf2 in Western Blot-Analysen; HUVEC wurden für 6h mit 1µM MG132 (+) und 0,1% DMSO (-) behandelt und das Zelllysat im Western Blot mit angegebenen Antikörpern detektiert

Durch eine Veränderung im Laufverhalten der Oligonukleotide in der PAGE konnte gezeigt werden, dass die doppelsträngigen Oligonukleotiden HSE und ARE mit Kernproteinen interagieren (s. Abb. 21a). Durch dieses Ergebnis konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den Kernproteinen um spezifische Transkriptionsfaktoren handelt. Der Nachweis für die Spezifität der Bindung sollte durch einen Kompetitions-Assay erbracht werden. Bei diesem Versuch, konkurrieren CY5 markierte Oligonukleotide mit unmarkierten Oligonukleotiden um die Bindung mit den Kernproteinen. Die unmarkierten Oligonukleotide sind nicht zu detektieren. Konkurrieren die Oligonukleotide um dasselbe Protein, würde die Signalstärke der markierten Oligonukleotide abnehmen, da das unmarkierte Oligonukleotid im Überschuss eingesetzt wurde und so

statistisch mehr Protein mit dem nicht detektierbaren Oligonukleotid interagiert. Die Spezifität der Bindung weist man dadurch nach, dass ein unmarkiertes Oligonukleotid der gleichen Sequenz des markierten Oligonukleotids die Bindung des markierten Oligonukleotids abschwächt, während ein unmarkiertes Oligonukleotid einer anderen Sequenz diesen Effekt nicht erzielen sollte. Diese Untersuchung der Bindungsspezifität wurde mit HeLa Kernextrakt durchgeführt. In Abb. 22 ist ein EMSA mit den Oligonukleotiden der Bindesequenz des  $\beta 1(\delta)$  HSE und ARE dargestellt. In den mit (–) gekennzeichneten Spuren wurden die Oligonukleotide mit Kernextrakt von HeLa für 30 Minuten bei 25° C inkubiert. In den Spuren, die mit (+) gekennzeichnet sind, wurden die Proben zusätzlich noch mit einem 10fachen Überschuss an Oligonukleotiden derselben Sequenz inkubiert, während in den mit (U) markierten Spuren unmarkierte Oligonukleotide einer anderen Sequenz dazugegeben wurden (s. Abb. 22).



**Abb. 22: Spezifitätsuntersuchung der Transkriptionsfaktorbindungen an regulatorischen Elementen des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors**

Kompetitiver EMSA: CY5 markierte doppelsträngige Oligonukleotide (ARE und HSE) wurden mit je 10  $\mu$ g HeLa Kernextrakt inkubiert. Den markierten Oligonukleotiden wurden spezifische unmarkierte Oligonukleotide in den mit (+) gekennzeichneten Fraktionen in 10-fachem Überschuss zugegeben. In den mit (U) gekennzeichneten Fraktionen wurden unspezifische Kompetitions-Oligos zugegeben. (B) kennzeichnet die Negativkontrolle, die nur mit BSA behandelt wurde.

Bei beiden Elementen (HSE und ARE) waren Komplexbildungen mit Proteinen des Kernextraktes durch höhermolekulare Migration (*Shift*) in dem Gel zu erkennen. Im Falle der HSE-Box verschwand der *Shift* nach Zugabe der Kompetitionsoligonukleotide,

und zwar sowohl bei der spezifischen als auch bei der unspezifischen Sequenz. Im Falle der ARE-Sequenz ließ sich die Bindung nur durch die spezifischen Oligonukleotide verdrängen. Daher kann man vermuten, dass die Sequenz der ARE-Box aus dem  $\beta 1(\delta)$ -Promotor spezifisch an den Faktor Nrf2 gebunden hatte, während die Bindung der Kernproteine an HSE als unspezifisch einzustufen ist.

Das HSE wurde außerdem auf Funktionalität und Bindungsspezifität untersucht. Bei der Funktionalitätsuntersuchung wurde das 130 bp-Promotorelement, welches das HSE beinhaltet, unter Hitzeschock-Bedingungen getestet. Der Promotorbereich mit dem Reporter gen wurde in HUVEC transfiziert und anschließend einem Hitzeschock von 42° C über eine Stunde ausgesetzt. Das Konstrukt MECL-1-Promotor wurde als Negativkontrolle ausgewählt, da innerhalb der Promotorsequenz kein HSE identifiziert werden konnte und daher davon auszugehen ist, dass dieses Konstrukt keine Reaktion auf den Hitzeschock zeigt.

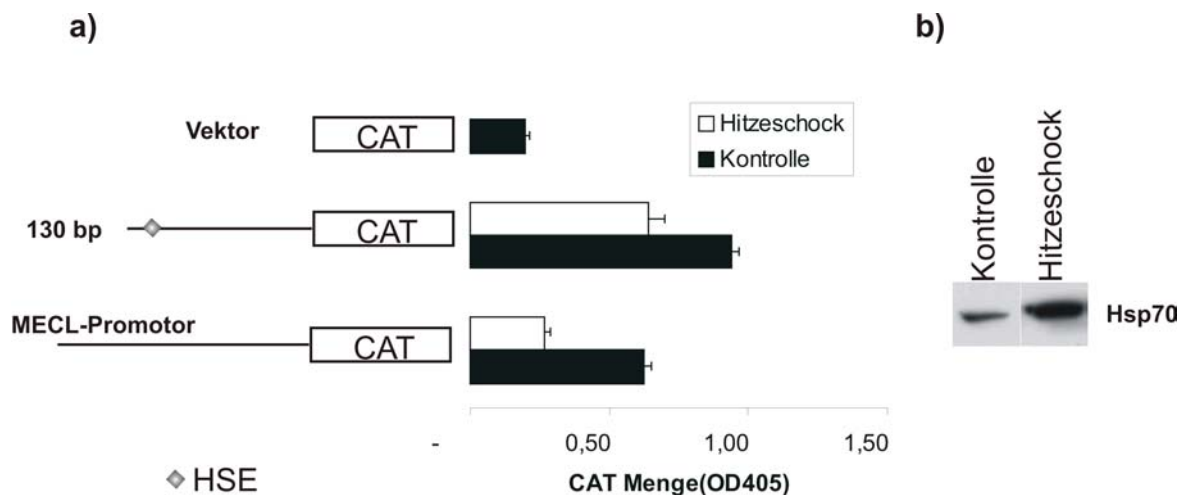


Abb. 23: **Funktionalitätstest von HSE im 130 bp  $\beta 1(\delta)$ -Promotor**

a) CAT-ELISA: HUVEC wurden mit dem 130 bp großem  $\beta 1(\delta)$ -Promotor-Reportergen Konstrukt (130 bp) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 42° C inkubiert und dann 2 Stunden zur Erholung bei 37° C belassen. Im Zelllysate wurde die CAT-Menge bestimmt und im Diagramm dargestellt (Hitzeschock = helle Balken; Kontrolle = dunkle Balken). Das HSE ist in der schematischen Darstellung der Konstrukte als Raute dargestellt. Zur Kontrolle wurden der Leervektor (Vektor) und der MECL-1-Promotor transfiziert und analysiert.

b) Kontrolle des Hitzeschocks: HUVEC-Zellen wurden wie in a) beschrieben einem Hitzeschock unterzogen und anschließend wurde im Zelllysate mittels Western Blot-Analysen Hsp70 nachgewiesen.

Wie in Abb. 23 dargestellt ist, nahm die CAT-Menge und somit die Promotor-Aktivität, sowohl von dem  $\beta 1(\delta)$ -Promotor, als auch von der Negativkontrolle MECL-1-Promotor

ab. Obwohl ein Hitzeschock stattgefunden hatte (s. Abb. 23b), wurde der  $\beta 1(\delta)$ -Promotor demzufolge nicht induziert. Die verringerte CAT-Menge ist vermutlich auf die denaturierende Wirkung des Hitzeschocks zurückzuführen, die das CAT-Protein beeinträchtigt haben könnte. Die gemessene CAT-Menge war gegenüber der MECL-1 Kontrolle nicht verändert, so dass davon auszugehen ist, dass das HSE nicht funktional ist. (s. Abb. 23). Ausgehend von den Hitzeschock Daten war zu erwarten, dass die Bindung des HSTF an dem Element des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors unspezifisch war. Dies bestätigt auch den Kompetitions-Test durch EMSA-Untersuchungen. In Abb. 22 erkennt man, dass sich das Signal sowohl von dem spezifischen als auch von dem unspezifischen Oligonukleotid unterdrücken lässt. Dieses putative *heat shock element* ist demzufolge nicht funktional.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Behandlung von Zellen mit Proteasom-Inhibitoren und der damit verbundenen Reduktion der proteolytischen Aktivität eine transiente Antwort induziert wird, indem alle proteasomalen Untereinheiten konzertiert hochreguliert werden. Inhibition des Proteasoms mit gleichzeitiger Inhibition der Transkription ließ auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation und nicht auf posttranskriptionelle Ereignisse schließen. Diese durch Inhibitor-induzierte Genaktivierung resultierte in einer *de novo* Protein-Synthese und somit in einer gesteigerten *de novo* Biogenese des Proteasoms. Dieses Phänomen wurde begleitet durch eine gesteigerte Expression des Maturationfaktors POMP. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Menge an Proteasom in Mammalia auf transkriptioneller Ebene reguliert wird und dass ein autoregulatorischer *feedback*-Mechanismus die verminderte proteolytische Aktivität kompensiert. Diese Daten werden unterstützt von CAT-Reporter-Gen-Assays mit dem Promotor der proteasomalen Untereinheit  $\beta 1(\delta)$ . Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die Promotor-Aktivität in Anwesenheit von Proteasom-Inhibitoren ansteigt. Die induzierbare Promotorregion konnte bis auf 130 bp upstream des Transkriptionsstartpunktes eingegrenzt werden. Die Bindung des Transkriptionsfaktors Nrf2 konnte durch EMSA-Technik nachgewiesen werden.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsanalysen und Promotorstudien durchgeführt, die Hinweise auf die Genregulation der proteasomalen Gene und die damit verbundene Biogenese geben sollten. Zum einen wurde die Interferon  $\gamma$ -Antwort von POMP detailliert untersucht, zum anderen wurde der durch Proteasom-Inhibitoren ausgelöste Stress als genregulatorisches Signal identifiziert und charakterisiert.

### 4.1 Die Genstruktur von POMP

Zur Untersuchung der Genregulation von POMP unter Interferon  $\gamma$ -Einfluss musste das POMP Gen genauer analysiert werden.

Das Maturierungsprotein POMP ist das humane Homolog des in Hefe beschriebenen UMP1. Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit war über die Genstruktur von POMP wenig bekannt. Griffin *et al.* vermuteten aufgrund von *expressed sequence tags* (EST)-Einträgen der NCBI-Datenbank zwei alternative Poly A-Signale für das humane Transkript (Griffin, et al., 2000). Diese Vermutung konnte durch einen Sequenzvergleich der cDNA-Einträge bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Es gibt verschiedene Beispiele in der Literatur, dass mehrere Transkriptvarianten eines Gens existieren, die differentiell reguliert sind. Zum Beispiel wurden kürzlich dem Gen einer Natrium-Kanal-Untereinheit alternative Transkriptvarianten mit Längenunterschieden sowohl in der 5'-UTR als auch in der 3'-UTR zugesprochen, die vermutlich entwicklungsabhängig differentiell reguliert werden (Shang and Dudley, 2004). Da es auch zwei verschiedene mRNA-Spezies von POMP gibt, die in vorliegender Arbeit POMP-L (*long*) und POMP-S (*short*) genannt wurden, könnte man auch hier zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen vermuten. Die beiden mRNA-Varianten unterscheiden sich nur in der Länge ihrer 3'-UTR. Da die 3'-UTR einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation einer mRNA ausüben kann, wäre eine Regulation der POMP mRNA Varianten über differentielle mRNA-Stabilität denkbar (Grzybowska, et al., 2001; Guhaniyogi and Brewer, 2001).

Erste Hinweise auf den Regulationsmechanismus lieferte die Analyse der putativen

POMP-Promotorregion. Hierbei konnten in der Region des möglichen Transkriptionsstartpunktes mehrere SP1-Elemente und somit GC reiche Regionen gefunden werden. Dies würde für den Promotor eines Haushaltsgens (*house keeping gene*) sprechen, zumal der Promotor keine TATA-Box aufweist. Aufgrund der Sequenzinformationen der beiden Transkripte (*Accession* Nummern AF125097 und AF077200; s. Abb. 3) wurde der Transkriptionsstartpunkt auf 85 Basen *downstream* des ATG festgelegt. Deletionsexperimente zeigten, dass die Region des Kern-Promotors innerhalb der ersten 200 Basen vor dem ATG liegt. Es konnten im 5' Bereich von POMP keine Interferon  $\gamma$ -induzierbaren *cis-acting* Elemente identifiziert werden. An diesem Punkt unterscheidet sich der POMP-Promotor von den Interferon  $\gamma$  induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms, die nachweislich funktionelle Interferon  $\gamma$  *cis-acting* Elemente besitzen (Barton, et al., 2002; Brucet, et al., 2004; Foss and Prydz, 1999; Hayashi, et al., 1997). Für  $\beta 5i$ (LMP7) ist die Funktionalität der potentiellen Interferon  $\gamma$ -stimulierbaren Elemente allerdings experimentell noch nicht bestätigt worden.

Es lässt sich vermuten, dass der Promotor von POMP durch unbekannte regulatorische Sequenzen beeinflusst wird oder ein anderer Regulationsmechanismus zum Tragen kommt.

## **4.2 Interferon $\gamma$ vermittelt keine Induktion der Transkription von POMP**

Interferon  $\gamma$  induziert das Immunoproteasom. Der Assemblierungsfaktor POMP wird auf mRNA-Ebene durch Interferon  $\gamma$  induziert (Witt, et al., 2000), was einen Einfluss dieses Faktors in der Assemblierung des Immunoproteasoms vermuten lässt. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe belegen die Beteiligung von POMP an der Immunoproteasom Biogenese (S. Heink, persönliche Mitteilung). POMP wird demnach sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf Protein-Ebene unter Einwirkung von Interferon  $\gamma$  induziert. Zur näheren Untersuchung der Induzierbarkeit der POMP-mRNA durch Interferon  $\gamma$  wurde der Promotorbereich durch Reportergenfusion ermittelt. Es konnte bis zu 4 kb *upstream* des Transkriptionsstartpunktes Promotor-Aktivität durch Luciferase-Reportergenfusion nachgewiesen werden. Je größer das Fragment des Promotors,

desto größer war dessen Aktivität. Das spricht für DNA-Sequenzen, die sich innerhalb der Sequenz der untersuchten 2,2 kb Fragment und dem 4 kb Fragment befinden müssen, an denen Regulationsfaktoren binden können.

Aus den Daten des Reporter-gen-Assays geht hervor, dass der Promotor von POMP nicht durch Interferon  $\gamma$  induziert wird. Es kommt sogar zu einer Reduktion der Aktivität, die auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein kann. Die Transkription könnte durch Interferon  $\gamma$  reduziert werden, indem Interferon  $\gamma$  aktivierte Faktoren den POMP-Promotor reprimieren. Andererseits wird die mRNA von POMP durch Interferon  $\gamma$  induziert. Eine Repression der Expression würde diesen Effekt nicht erklären. Eine andere Möglichkeit ist in der Interferon  $\gamma$  induzierten Signalkaskade zu suchen. Es wird zum Beispiel auch das Gen RNase L durch Interferon  $\gamma$  induziert. Die RNase L wird jedoch erst nach zusätzlichem Stimulus durch doppelsträngige RNA aktiviert, es ist dennoch denkbar, dass eine geringe aktivierte Menge an RNA ausreichen würde, die Luciferase-mRNA abzubauen (Player and Torrence, 1998). Für eine generelle Reduktion der Luciferase in Anwesenheit von Interferon  $\gamma$  spricht auch die Reduktion der Luciferase-Aktivität des CMV-Promotors in einer ähnlichen Größenordnung wie die des POMP-Promotors (s. Konstrukt Nr.1 in Abb. 9a). Dagegen spricht die Induktion der Positivkontrolle durch Interferon  $\gamma$ . Die in vorliegender Arbeit gemessene Induktion entspricht der mRNA-Induktionsstärke, die von Foss *et al.* detektiert wurde (Foss and Prydz, 1999). Die Aussage dieser Experimente ist dennoch, dass der POMP-Promotor nicht durch Interferon  $\gamma$  induziert wird.

Die POMP-mRNA wird also auf andere Weise nach Interferon  $\gamma$ -Stimulus induziert. Es gibt mittlerweile verschiedene Untersuchungen zu alternativen Regulationswegen. So können Transkriptionsfaktoren regulatorische Sequenzen in Introns binden und dadurch die Transkription in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Le Hir, et al., 2003). Da im Falle des POMP-Gens im ersten Intron mehrere putative Interferon  $\gamma$ -stimulierbare Elemente identifiziert wurden, wäre es denkbar, dass diese Elemente über einen Interferon  $\gamma$ -Regulationsweg die Transkriptionsinitiation beschleunigen. Anhand der Daten der Luciferase-Assays konnte die Funktionalität dieser Elemente nicht nachgewiesen werden. Die Interferon  $\gamma$  *cis-acting* Elemente würden nach Tian *et al.* im Promotorbereich liegen. Denn Tian *et al.* postulierten 2002 einen alternativen Transkriptionsstartpunkt des Kali-

um-Kanal-assoziierten Proteins KCNA4B, welches zu 100% mit POMP homolog ist. Dort schlagen die Autoren den Beginn des Transkriptes am 5'-Anfang des Exons 2 vor. Das würde den Promotor um 4 kb in 3'-Richtung des ursprünglich angenommenen Promotors verschieben. Ähnliches wurde schon für das Gen der Immununtereinheit PSMB8 (LMP7) beobachtet (Glynne, et al., 1993). Im Falle der POMP mRNA würde die 5'-UTR wegfallen. Das wiederum könnte eine neue Promotorregion zur Folge haben, welche am Ende des ersten Introns und kurz vor dem 2. Exon zu finden wäre. Diese Möglichkeit ist unwahrscheinlich, weil die Translationsinitiation am Ende von Exon 1 liegt. Außerdem konnte ein Spleißen des Luciferase Konstruktes mit Intron1 eindeutig nachgewiesen werden (s. Abb. 9b).

Eine andere Möglichkeit der Regulation könnte in der mRNA-Stabilität bestehen. Den Sequenzen einer 3'-UTR werden verschiedenen Funktionen zugeschrieben. Sie können die Stabilität einer mRNA oder sogar die Translationsinitiation einer mRNA verändern (Grzybowska, et al., 2001; Guhaniyogi and Brewer, 2001; Wilkie, et al., 2003). In der Sequenz der mRNA von POMP ist der große 3'-UTR Bereich sehr auffällig. Die Sequenzdaten der 3'-UTR weisen mehrere AU-reiche Sequenzen auf. AU-reiche Sequenzen wurden ursprünglich als destabilisierende Sequenzen eines 3'-UTR Bereiches der mRNA angesehen (Shaw and Kamen, 1986). Später erkannte man, dass auch die AU-reichen Sequenzen durch verschiedene RNA-bindende Proteine stabilisierende Funktionen erlangen können (Brennan and Steitz, 2001). So wurde bei Bindung mit Faktoren, wie z.B. Hel-N1, die mRNA von c-Myc in humanen Neuronen stabilisiert (Levine, et al., 1993). Es wurden außerdem mehrere an AU-reiche Sequenzen bindende Faktoren identifiziert, welche mRNA stabilisieren können (Peng, et al., 1998). Ähnliche Mechanismen könnte man auch bei POMP vermuten. Zur Untersuchung der mRNA-Stabilität wurde die lange 3'UTR Variante von POMP im Reporter-gen-Assay getestet (s. Abb. 9). Weder konnte die 3'UTR von POMP alleine, noch in Verbindung mit dem POMP-Promotor oder zusätzlich mit dem Intron 1 einen Effekt erzielen. Im Vergleich zu dem POMP-Promotor ohne die 3'-UTR sind keine Unterschiede in der Expression der Luciferase zu erkennen. Dies weist eindeutig darauf hin, dass die lange Form der POMP 3'UTR (POMP-L) weder eine stabilisierende, noch eine destabilisierende Wirkung auf die POMP Expression unter Einfluss von Interferon  $\gamma$  besitzt.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist in der kurzen Form, POMP-S, zu suchen. Die 3'-UTR von POMP-S ist nur ca. 100 bp lang. Zusammen mit der kodierenden Sequenz ergibt das eine Größe von ca. 600 bp. Dieses Transkript ist im Gegensatz zu POMP-L sehr gut in Northern Blot Analysen detektierbar. Daher konnte die Stabilität der mRNA durch den RNA Polymerase II-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin untersucht werden. Wie in Abb. 10 gezeigt, wurde die mRNA des POMP-S-Gens in Anwesenheit von Interferon  $\gamma$  tatsächlich stabilisiert. Anscheinend gibt es bei POMP zwei Transkripte, die sich nur in der Länge der 3'-UTR unterscheiden und von denen POMP-S Interferon  $\gamma$  induzierbar ist. Witt *et al.* vermuteten im Jahr 2000 schon zwei POMP mRNA Spezies (Witt, et al., 2000). Es wurde vorgeschlagen, dass die eine Form POMP exprimieren, welches in die Maturierung des konstitutiven Proteasoms involviert ist, die andere Form sollte die Biogenese des Immunoproteasoms unterstützen (Witt, et al., 2000). Da sich innerhalb des ca. 100 Basen großen Sequenzbereichs der kurzen Form der POMP 3'-UTR keine bekannten *cis-acting* Sequenzen identifizieren ließen, spielen hier möglicherweise unbekannte stabilisierende *cis-acting* Elemente eine Rolle. Diese Sequenzen sind damit natürlich auch Teil der langen 3'-UTR Variante. Denkbar wäre, dass bei dieser mRNA Variante Sequenzbereiche am 3'-Ende der 3'-UTR mit den stabilisierenden Elementen am 5'-Ende der 3'-UTR konkurrieren. Die Funktion der längeren POMP mRNA ist noch unklar. Eventuell spielt sie nur eine gewebsspezifische Rolle, da EST-Einträge, die vom 3'-Ende sequenziert wurden, nur in Geweben wie Dickdarm, Plazenta und Niere existieren.

Die Interferon  $\gamma$ -Induktion von POMP ist anderer Natur als die der Immununtereinheiten des Proteasoms (s. 1.3.1). Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da die Biogenese des Immunoproteasoms vermutlich von POMP unterstützt wird (Griffin, et al., 2000; Witt, et al., 2000); mündliche Mitteilung von Sylvia Heink) und es daher zu erwarten war, dass POMP auf eine ähnliche Weise wie die Immununtereinheiten durch Interferon  $\gamma$  induziert wird. Dies war aber nicht der Fall. Eventuell spielt hier die zeitliche Reihenfolge eine Rolle, denn die mRNA von POMP ist in VSMC relativ stabil (Beobachtung aus unserer Arbeitsgruppe). Dort ist die POMP-S-mRNA über 8 h stabil (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu einer transkriptionellen Induktion würde also das POMP Transkript zeitlich versetzt exprimiert werden. Denn bei einer Stabilisierung eines schon relativ stabilen Transkriptes findet die Induktion sehr langsam statt. Vermutlich wird das

Genprodukt POMP in der Biogenese des Immunoproteasoms erst zu einem späteren Zeitpunkt benötigt. Frentzel *et al.* zeigten, dass die Dauer für den Biogenese-Prozess des 20S Proteasoms einen Zeitraum von nahezu 8 Stunden umfasst (Frentzel, et al., 1994). Aufgrund von *Pulse-chase* Experimenten in Anwesenheit des Translations-Hemmstoffs Cycloheximid vermuteten Frentzel *et al.* die Notwendigkeit fortlaufender Proteinsynthese für die Biogenese des Proteasoms (Frentzel, et al., 1994). Dies würde auch dafür sprechen, dass die Expression einzelner Komponenten, wie z.B. des Proteins POMP, zeitlich versetzt erfolgt. Im Falle von POMP würde dies durch eine unterschiedliche Kontrolle der Genexpression im Vergleich zu den proteasomalen Immununtereinheiten erreicht. Möglicherweise gilt das nur für das Immunoproteasom, da in vorliegender Arbeit gezeigt wurde, dass die Regulation von POMP der des konstitutiven Proteasoms ähnelt.

### **4.3 Induktion proteasomaler Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren**

Proteasom-Inhibitoren wie *clasto*-Lactacystin und MG132 blockieren die proteolytische Aktivität des Proteasom durch Bindung an  $\beta 5(\text{MB1})$  (Groll, et al., 1997). Diese Inhibition unterbindet den Ubiquitin-Proteasom-Degradationsweg und verhindert so den Abbau von vielen zellulären Proteinen. Diese Inhibition führt bei Zellen konzentrationsabhängig zu Apoptose (zusammengefasst in (Drexler, 1998). Wie die Zellen die geringere Menge an aktiven Proteasomkomplexen kompensieren, ist in der vorliegenden Arbeit näher untersucht worden.

Die Daten der quantitativen RT-PCR in Tab. 2 weisen deutlich auf eine gemeinsame Regulation proteasomaler Untereinheiten hin. Als Reaktion auf die Inhibition des Proteasoms wurde die mRNA verschiedener proteasomaler Untereinheiten signifikant induziert. Nicht alle Untereinheiten werden im gleichen Maße hochreguliert, aber die Untereinheiten des 20S Proteasoms und die meisten Untereinheiten des 19S Regulators werden zwischen 1,5fach und 4fach induziert. Ein deutliches Zeichen für eine spezifische, gemeinsame Regulation des konstitutiven Proteasoms ist darin zu sehen, dass die Expression der Immununtereinheiten kaum verändert ist. Die Immununtereinhei-

ten unterliegen somit vermutlich einem anderen Regulationsmechanismus.

Die konzertierte Induktion der konstitutiven Untereinheiten ist zeit- und konzentrationsabhängig (s. Abb. 14 und (Meiners, et al., 2003). Die Konzentration des Inhibitors ist insofern von Bedeutung, da die Menge an aktivem Proteasom nicht zu gering werden darf. Dies hätte Apoptose durch die Akkumulation von zum Beispiel Tumor-Suppressor p53 oder von Hitzeschock-Proteinen, proapoptotischen Proteinen wie Bax und Bid oder Proteine der Caspase-Familie zur Folge (Breitschopf, et al., 2000; Chen, 2003 #429; Bush, et al., 1997; Li and Dou, 2000; Lopes, et al., 1997). Die Zeitabhängigkeit, die bei Meiners *et al.* gezeigt wurde, bezieht sich auf die transiente Form der Induktion (Meiners, et al., 2003). Die Induktion hatte nach 12 h ihr Maximum erreicht und nahm danach wieder ab. Diese Form der Transkriptionsinduktion deutet häufig auf einen Rückkopplungsmechanismus hin (Becskei and Serrano, 2000). In diesem Fall wird ein Faktor eine Induktion so lange aufrechterhalten, bis ausreichend Produkt vorhanden ist, welches wiederum die Induktion des Faktors verhindern kann und es zu einem Rückgang der Stimulation kommt.

Die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems wurde schon unter anderen Bedingungen beobachtet. So wird bei verschiedenen Krankheiten, wie Diabetes, Muskelatrophie, Azidose, Urämie und Krebs die Expression des Proteasoms aktiviert (Bailey, et al., 1996; Baracos, et al., 1995; Mitch, et al., 1999; Price, et al., 1996). Die jeweilige Induktions-Stärke korreliert mit der von uns gemessenen 2-4fachen Induktion (Meiners, et al., 2003). Diese Daten weisen eindeutig auf eine gemeinsame Regulation der Genexpression proteasomaler Untereinheiten hin und wurden in dieser Arbeit eingehender untersucht.

#### **4.3.1 Proteasom-Inhibitoren induzieren die Expression proteasomaler Untereinheiten auf Ebene der Transkriptionsinitiation**

Die vermehrte mRNA-Expression proteasomaler Untereinheiten kann mehrere Ursachen haben. Vermutlich werden ein oder mehrere Faktoren nicht mehr durch das Proteasom abgebaut, welche dann zu einer erhöhten mRNA-Menge führen. Dies könnte durch eine Bindung von Faktoren an den Promotor bewirkt werden, was die Steigerung

der Transkriptionsrate zur Folge hätte. Möglich wäre auch eine Interaktion mit untranslatierten Regionen der mRNA selbst. Sowohl die Bindung an der 5'-UTR als auch die Bindung an der 3'-UTR kann stabilisierende Auswirkungen für die mRNA haben (Grzybowska, et al., 2001; Tebo, et al., 2000). In Hefe wird das Proteasom transkriptionell reguliert (Mannhaupt, et al., 1999; Xie and Varshavsky, 2001). Eine mRNA-Stabilisierung unter Einfluss von Proteasom-Inhibitoren konnte in Mammalia ausgeschlossen werden (s. Abb. 12). Auch die POMP-mRNA wird unter diesen Bedingungen nicht stabilisiert. Deshalb konnte sicher davon ausgegangen werden, dass die konzentrierte Induktion proteasomaler Untereinheiten auf transkriptioneller Genkontrolle beruht. Eine Induktion der  $\alpha 2(C3)$ -Untereinheit bei Diabetes und Muskelatrophie ist mit diesen Beobachtungen in Einklang zu bringen, da auch hier eine transkriptionellen Kontrolle beobachtet wurde (Du, et al., 2000; Mitch, et al., 1999).

#### **4.3.2 Induktion der proteasomalen Untereinheiten durch Proteasom-Inhibitoren auf Proteinebene**

Nach Inhibition des Proteasoms stellt sich ein drastischer proteasomaler Aktivitätsverlust ein (ca. 80 %ige Reduktion der Aktivität, s. Abb. 13b). Da die Zellen dies auch für einen längeren Zeiträumen überleben, muss sich ein Mechanismus entwickelt haben, der dieses Defizit ausgleichen kann. Ein negativer *feedback*-Mechanismus, wie in *Saccharomyces cerevisiae*, wäre eine Möglichkeit, dieses zu kompensieren (Ju, et al., 2004). Um dies zu zeigen, musste zunächst nachgewiesen werden, dass die erhöhte mRNA Menge auch zu einer vermehrten Protein-Synthese führt.

Es ist bekannt, dass der Proteasom-Inhibitor zu einer Verringerung der Autoprozessierung aktiver  $\beta$ -Untereinheiten führt, so dass es zu einer Akkumulation von *Precursor*-Komplexen des Proteasoms kommt (Chen and Hochstrasser, 1996; Heinemeyer, et al., 1997; Schmidtke, et al., 1997). Frentzel *et al.* zeigten für Maus-RMA-Zellen eine Reifung des Proteasoms in ca. 4-8 h, so dass nach 8 h Inhibition die Biogenese des Proteasoms stark verlangsamt ablaufen dürfte (Frentzel, et al., 1994). Der in dieser Arbeit in Abb. 13 dargestellte Anstieg der Proteinmenge ausgewählter proteasomaler Untereinheiten kann also Folge der unvollständigen Assemblierung sein. Der *Precursor*-



Anstieg ist jedoch auf eine *de novo* Synthese zurückzuführen (s. Abb. 14), denn die Menge an metabolisch markierten und damit neu synthetisierten Proteasomen ist unter Proteasom-Inhibitor Behandlung deutlich erhöht. Das Bandenmuster der Präzipitate entspricht dem von reifen Proteasomen (Fig.1b in (Frentzel, et al., 1994)). Die neu synthetisierten Proteine sind daher schon prozessiert worden und haben die Proteasom-Maturierung durchlaufen (Chen and Hochstrasser, 1996; Frentzel, et al., 1994; Schmidtke, et al., 1997; Seemuller, et al., 1996). Bisher konnte damit gezeigt werden, dass die proteasomalen Untereinheiten über *de novo* Synthese nach Inhibition des Proteasoms hochreguliert werden. Zur Untersuchung, ob die verstärkte Expression einzelner proteasomaler Untereinheiten in maturiertes 20S Proteasom mündet, sollte die Proteasom-Biogenese analysiert werden.

Die Biogenese des Proteasoms ist eng an den Maturierungsfaktor POMP gebunden (Witt, et al., 2000). Deshalb wurde auch die Genexpression von POMP nach Inhibition des Proteasoms untersucht. Daher ist zu erwarten, dass bei einer vermehrten Biogenese des Proteasoms in gleichem Ausmaß mehr POMP benötigt wird. Präzipitierte *Precursor*-Komplexe aus metabolisch markierten Zellen, wie in Abb. 16 dargestellt, beinhalten deutlich mehr POMP in den mit Proteasom-Inhibitor behandelten Proben. Der Anstieg der Proteinmenge von POMP ist ebenfalls auf eine erhöhte *de novo* Synthese zurückzuführen. Die POMP-mRNA steigt im gleichen Maße an wie die der proteasomalen Untereinheit Rpt1 (S7). Dieser Anstieg beruht ebenfalls nicht auf mRNA-Stabilität (s. Abb. 12). Es ist also davon auszugehen, dass hier derselbe Mechanismus wie für die Induktion der proteasomalen Untereinheiten zu Grunde liegt.

Die Hypothese, dass ein komplett neues Biogenese-Programm durchlaufen und dadurch neues, reifes Proteasom gebildet wird, konnte durch eine Dichte-Gradienten-Fraktionierung der zellulären Komplexe beantwortet werden (s. Abb. 17). Wie schon im Western Blot des Totallysates ist auch im Western Blot der Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation ein starker Anstieg an Proteasom-Vorläufern zu erkennen (s. Abb. 17; Fraktionen 19-23). Hier wurde deutlich gezeigt, dass die Blockierung des Proteasoms über eine *de novo* Synthese und Biogenese zu reifem Proteasom führte. Das bedeutet, dass POMP vermutlich eine Schlüsselrolle in der Homöostase der Proteasom-Menge in einer Zelle spielt. Ohne POMP würde die Biogenese vermutlich verlangsamt

ablaufen, wie es für *Saccharomyces cerevisiae* schon gezeigt wurde. Die Induktion des Proteasoms wäre verzögert oder verhindert (Ramos, et al., 1998).

Des Weiteren war eine Verschiebung der Signale von Rpt1(S7),  $\beta 1(\delta)$  und des Antikörpers gegen das 20S Proteasom in Richtung der 26S Fraktionen zu beobachten (s. Abb. 17). Aus elektronenmikroskopischen Studien geht hervor, dass es drei unterschiedliche Zustände des Proteasoms gibt: Das 20S Proteasom kommt frei, oder als ein- bis zweifach mit dem 19S Regulator assoziierter Komplex in der Zelle vor (Walz, et al., 1998). Die Verschiebung des Bandenmusters im Gradienten zu den höhermolekularen Fraktionen könnte eine vermehrte Bildung von 26S Proteasomen zur Ursache haben, die mit zwei 19S Komplexen assoziiert sind. Das 26S Proteasom interagiert häufig auch mit Chaperonen, wie zum Beispiel dem Hitzeschock-Protein Hsp90 (Eleuteri, et al., 2002). Solche Chaperone werden auch durch Proteasom Inhibition induziert, was vermuten lässt, dass es zu einer vermehrten Assoziation zwischen Proteasom und Hsp90 kommen könnte.

Die moderate mRNA Induktion und der damit verbundene äquivalente Proteinanstieg sind relativ zu der Menge des Proteasoms in einer Zelle zu sehen. Das Proteasom hat einen Anteil von etwa 1 % der Gesamtproteinmenge (Tanaka and Ichihara, 1989), bei einer 2-4 fachen Steigerung dieser Menge an Proteasom, wäre der Anstieg im Vergleich zur Gesamtproteinmenge ausreichend, um eine Kompensation der Inhibition zu erklären.

#### **4.4 Untersuchung der Promotorregion von $\beta 1(\delta)$ durch Reportergenfusion und EMSA**

Proteasom-Inhibitoren verändern das metabolische Gleichgewicht der Zelle (Rock, et al., 1994). Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass die Zelle auf die Störung der Homöostase mit einer kompletten *de novo* Biogenese des Proteasoms reagiert. In *Saccharomyces cerevisiae* ist der Transkriptionsfaktor Rpn4 der Schlüssel-Faktor, der für eine konzentrierte Regulation des Proteasoms verantwortlich ist (Ju, et al., 2004; Mannhaupt, et al., 1999; Xie and Varshavsky, 2001). In Mammalia konnte bisher kein homologer Mechanismus gefunden werden. Die transkriptionelle Hochregulation der

proteasomalen Untereinheiten im Säugersystem lässt jedoch einen ähnlichen Mechanismus wie in *Saccharomyces cerevisiae* vermuten.

Zur detaillierten Untersuchung der proteasomalen Genkontrolle wurde der  $\beta 1(\delta)$ -Promotor verwendet, da  $\beta 1(\delta)$  schon Gegenstand der Expressionsanalysen war und es mit 2,5facher Induktion in der quantitativen RT-PCR eine durchschnittliche Hochregulation aufwies (s. Tab. 2). Die Promotorregion von  $\beta 1(\delta)$  ist bisher noch nicht publiziert. Daher war es nötig, die Funktionalität des Promotors zu untersuchen. Im 5' Bereich des Gens konnte eine Vielzahl von repetitiven Sequenzen gefunden werden, die ab 600 Basen vom Transkriptionsstart entfernt vorkommen (Daten nicht gezeigt). Diese Sequenz-Motive könnten auch auf eine Art epigenetischer Kontrolle hindeuten (Grewal and Moazed, 2003). Dies wurde allerdings nicht eingehender untersucht, da repetitive Sequenzen kein gemeinsames Merkmal der proteasomalen Untereinheiten sind.

Im Gegensatz zum POMP-Promotor wurde die Aktivität des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors mit zunehmender Länge nicht deutlich stärker (s. Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass sich nur wenige Kontrollelemente außerhalb des Minimalpromotors befinden.

Die Induktion der proteasomalen Gen-Expression ist von der Konzentration des Inhibitors und dem Zeitraum der Inkubation abhängig (Meiners, et al., 2003). Der Inkubationszeitraum der CAT-Assays lag bei 16 h, war also doppelt so lang wie bei den Western Blot-Analysen. Dies ist der Grund, warum der Proteasom-Inhibitor in dem CAT-Assay 100fach geringer konzentriert war als er bei den Northern und Western Blot-Analysen eingesetzt wurde. Ein anderer Grund ist, dass die Empfindlichkeit des CAT-Systems gegenüber Proteasom-Inhibitoren um ein vielfaches höher lag als die in Western und Northern Blot-Analysen. Ein anderes Reportergen-System, das der Luciferase, wurde sogar für ungeeignet im Hinblick auf die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren erklärt (Deroo and Archer, 2002). Es ist davon auszugehen, dass dieses System extrem sensitiv auf Inhibitoren reagiert.

Der  $\beta 1(\delta)$ -Promotor wird durch proteasomale Inhibition aktiviert. Bei geringen Mengen des Inhibitors wird der Promotor 1,5 bis 2fach induziert, was mit den Daten der *real time* PCR für PSMB6 in Tab. 2 korreliert. Dies lässt vermuten, dass durch den verminderten Abbau von Proteinen ein Regulationsweg aktiviert wird, der in einer Steigerung der

Transkription proteasomaler Untereinheiten mündet. Diese Aktivierung ist in dem Reporter-Gen-Modell für das Gen  $\beta 1(\delta)$  spezifisch, da bei ähnlicher Stimulation des MECL-1-Promotors keine Induktion zu beobachten war. Sowohl für die Stimulation als auch für die Grundaktivität des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors waren eine Promotorgröße von 130 bp notwendig (s. Abb. 19). Es gab kaum Unterschiede zwischen der Induktionsstärke des 1,5 kb und des kleinsten Stückes mit 130 bp, so dass davon auszugehen ist, dass sich alle für die Induktion notwendigen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses 130 bp Sequenzbereiches befinden. Daraus geht hervor, dass die Induktion des proteasomalen Gens  $\beta 1(\delta)$  auf eine erhöhte Promotoraktivität zurückzuführen ist.

Bisher war im Zusammenhang mit proteasomaler Genexpression in Mammalia wenig bekannt. Das einzige Motiv, welches man für eine gemeinsame Regulation verantwortlich machen könnte, wurde in der Maus gefunden. Es handelte sich dabei um den Transkriptionsfaktor Nrf2, der bei oxidativem Stress eine Rolle spielt (Kwak, et al., 2003). Dieser Faktor bindet an das 5' cis Element ARE (*antioxidant response element*) (Itoh, et al., 1997). Dieses Element konnte auch im Gen von PSMB6 ( $\beta 1(\delta)$ ) 5' Bereich identifiziert werden (s. Abb. 20).

Eine weitere in Frage kommende regulatorische Bindestelle war das Hitzeschock-Element (HSE) an Position -130, an den der Transkriptionsfaktor HSTF1 bindet. Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren werden durch Proteasom-Inhibitoren aktiviert (Bush, et al., 1997; Kim, et al., 1999; Pritts, et al., 2002; Zhou, et al., 1996). Eine Bindung an diese Elemente konnte *in vitro* mittels EMSA gezeigt werden (s. Abb. 22). Im Falle des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors konnte allerdings keine Spezifität der Bindung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte durch Messung der Promotoraktivität nach einem Hitzeschock bestätigt werden. Während Hsp70, welches von HSTF1 reguliert wird, auf Proteinebene stark induziert wurde, konnte der  $\beta 1(\delta)$ -Promotor nicht stimuliert werden (Zhou, et al., 1996). Das Hitzeschock-Element im Promotorbereich von  $\beta 1(\delta)$  hat also keine physiologische Relevanz. Normalerweise kommen Hitzeschock-Elemente in repetitiver Form vor (La Volpe, et al., 1988). Ein weiteres Indiz dafür, dass dieser Faktor nicht für die proteasomale Hochregulation alleine verantwortlich sein kann, ist die Abwesenheit dieses Elementes in den meisten 5'-Bereichen der proteasomalen Gene (s. Tab. 3). Kuckelkorn *et al.* konnten außerdem für die proteasomalen Gene PSMA2 ( $\alpha 2$ )

und PSMA4 ( $\alpha 3$ ) zeigen, dass die Transkripte unmittelbar nach einsetzendem Hitzeschock reprimiert werden (Kuckelkorn, et al., 2000). Dieses Ergebnis korreliert auch mit den Ergebnissen von Frentzel *et al.* die in proteasomalen Genen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* PRO-dm35 ( $\alpha 1$ ) und PRO-Dm28.1 ( $\alpha 7$ ) jeweils nicht funktionelle Hitzeschock-Elemente im 5'-Bereich identifiziert haben (Frentzel, et al., 1992). Es scheinen nur zufällige Sequenzübereinstimmungen mit HSE zu sein, die keine regulatorische Relevanz besitzen.

Nrf2 hingegen bindet spezifisch an die Sequenz der  $\beta 1(\delta)$  Promotorregion (s. Abb. 22). Dies konnte durch die Kompetitions-Analysen vermutet werden. Die Menge an gebundenem Nrf2 war nach MG132 Behandlung unverändert, obwohl der Level der Transkriptionsfaktoren HSTF1 und Nrf2 nach Inhibitor-Behandlung im Zellkern markant erhöht war (s. Abb. 21). Da die Stimulation von  $\beta 1(\delta)$  auf mRNA-Ebene etwa dem doppelten bis dreifachen der Kontrollen entsprach, war ein starker Effekt nicht zu erwarten. Das experimentelle Design könnte aber an dieser Stelle noch verändert werden, so dass auch eine quantitativ höhere Bindung von Nrf2 an ARE detektiert werden könnte. So werden Transkriptionsfaktoren in einem anderen Zeitfenster aktiviert als die Induktion auf Proteinebene. Demnach würde eine Verschiebung der Inkubationszeit mit Proteasom-Inhibitor einen deutlicheren Effekt erzielen.

Proteasomale Gene werden in der Maus nach oxidativem Stress durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 hochreguliert (Kwak, et al., 2003). Nrf2 bindet an das *cis-acting*-Element ARE (Itoh, et al., 1997). Diese Elemente konnten ebenfalls im 5' Bereich vieler humaner proteasomaler Gene gefunden werden (s. Tab. 3). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Faktor auch in der Gen-Kontrolle bei Stress durch verminderte Proteolyse eine Rolle spielen könnte. Nrf2 wird von einem cytoplasmatischen Bindeprotein Keap1 am Cytoskelett arretiert und dem 26S Proteasom im Cytoplasma zur Degradation zugeführt (Nguyen, et al., 2003; Zhang and Hannink, 2003). Wird Nrf2 durch Phosphorylierung oder Einwirkung von ROS von Keap1 gelöst, akkumuliert es im Zellkern (Huang, et al., 2002; Itoh, et al., 1999). Dort wird Nrf2 ebenfalls durch das 26S Proteasom degradiert (Itoh, et al., 2003). Fehlt dieser Degradationsweg, häuft sich dieser Transkriptionsfaktor im Kern an und kann mit Hilfe von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. einem Protein der Maf-Familie, als Heterodimer seine Zielsequenz binden (Bloom and Jaiswal,

2003; Motohashi, et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von Nrf2 zur Aktivierung der Transkription eines Reportergens führte (Itoh, et al., 1995). Das deutet darauf hin, dass eine Akkumulation von Nrf2 im Zellkern ausreichen könnte, um ARE-haltige Promotoren, wie beispielsweise den  $\beta 1(\delta)$ -Promotor, zu induzieren. Nguyen et al. konnten außerdem zeigen, dass ein Reportergen mit ARE-haltigem Promotor durch MG132 oder *clasto*-Lactacystin stimulierbar war (Nguyen, et al., 2003). Die Induktion betrug 2,5 – 3,5fach im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, und lag somit ein wenig höher als die Induktion in vorliegender Arbeit, korreliert aber klar mit den Daten aus der *Real time* RT-PCR (s. Tab. 2). Es wurde außerdem gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren Kinasen wie MAP / ERK aktivieren (Shibata, et al., 2002). Die Kinasen können eine nicht unerhebliche Rolle in der Aktivierung von Nrf2 haben (Numazawa and Yoshida, 2004). Nrf2 besitzt noch weitere Merkmale, die es als Kandidat für die Regulation eines negativen Rückkopplungsmechanismus des Proteasoms interessant machen. Der Transkriptionsfaktor wird nicht nur vom Proteasom abgebaut, sondern aktiviert sich auch selbst durch ein ARE im Nrf2 Promotor (Kwak, et al., 2002). Des Weiteren erfüllt Nrf2 nicht nur eine Aufgabe in der Abwehr von ROS, sondern ist auch an einer Reihe von anderen Prozessen beteiligt. Nrf2 greift in die Stress-Antwort des Endoplasmatischen Retikulums ein, spielt eine Rolle bei der Wundheilung und bei der Apoptose (Braun, et al., 2002; Cullinan, et al., 2003; Morito, et al., 2003). Alle diese Indizien verdeutlichen, dass dieser Transkriptionsfaktor nicht nur in der Abwehr von ROS eingreift, sondern auch durchaus viele andere zelluläre Prozesse aktiviert, so zum Beispiel auch das Proteasom. Ein Model für diesen Regulationsweg ist in Abb. 24 dargestellt.

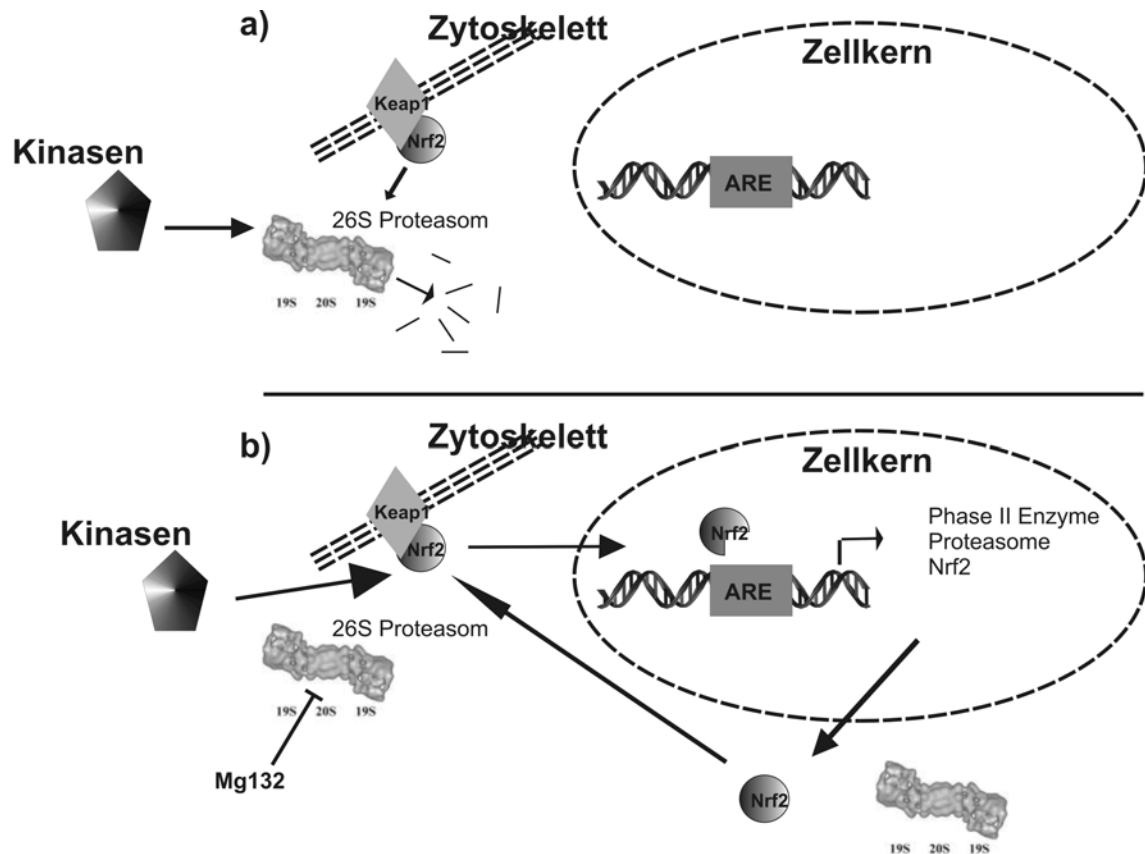


Abb. 24: **Model der induzierten Proteasom-Expression nach Proteasom-Inhibitorbehandlung**

a) Situation von unbehandelten Zellen: Keap1 arretiert Nrf2 am Zytoskelett und führt es der Degradation durch das Proteasom zu. Nrf2 kann nicht in den Zellkern migrieren und keine Zielgene aktivieren. Kinasen wie MAP / ERK werden durch das Proteasom abgebaut.

b) Situation in Anwesenheit von Proteasom-Inhibitor (MG132): Die verminderte Degradation von Nrf2 führt zu gestiegenen Mengen an Nrf2 im Zellkern. Zusätzlich werden weniger Kinasen abgebaut und können Nrf2 von Keap1 freisetzen und aktivieren. Dadurch werden die Zielgene transkribiert. Die Zielgene sind ROS – Abwehr Enzyme (Phase II Enzyme), das Proteasom und Nrf2 selber. Durch die Aktivierung von Nrf2 kommt es zu einem Rückkopplungsmechanismus. (Modifiziert nach (Itoh, et al., 2003))

Bei einigen proteasomalen Genen konnte keine ARE-Sequenz gefunden werden. Dies könnte daran liegen, dass nach 100 %iger Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz gesucht wurde. Falls für die Aktivierung aber eine geringere Übereinstimmung ausreicht, würde man eventuell in allen Untereinheiten eine Aktivierungssequenz finden. Andererseits wäre auch denkbar, dass nicht alle Untereinheiten auf identische Weise aktiviert werden, sondern auch über andere Transkriptionsfaktoren. Dies würde eine zusätzliche Heterogenität der Proteasom-Struktur gewährleisten, indem die Möglichkeit besteht, einzelne Untereinheiten unterschiedlich zu regulieren (Masson, et al., 2003). Tamura *et al.* vermuteten schon 1994 für die humanen Transkripte der protea-

somalen Gene PSMA2( $\alpha$ 2) und PSMA5( $\alpha$ 5) eine unterschiedliche Regulation (Tamura, et al., 1994). Eine andere Möglichkeit ist die, dass mindestens zwei Faktoren involviert sind. Das Glutathione S-Transferase (GST)-Gen, welches für eines der Proteine der Oxidationsabwehr kodiert, wird zum Beispiel von einem Promotor kontrolliert, in dem das *CCAAT/enhancer binding protein-beta* (C/EBPbeta) zusammen mit Nrf2 die Transkription beeinflusst (Park, et al., 2004). Wird nur einer der Co-Faktoren angeboten, wird die Expression zur Hälfte reduziert (Park, et al., 2004). 2002 wurde C/EBPbeta, der Transkriptionsfaktor, der durch Glucocorticoide stimuliert wird, mit dem Proteasom in Verbindung gebracht (Penner, et al., 2002). Die Vermutung liegt also nahe, dass ein weiterer Faktor in die Kontrolle eingreift. Das würde zumindest erklären, warum nicht alle proteasomalen Untereinheiten dieses ARE besitzen. Es wäre also noch mindestens ein weiterer Faktor nötig, um die Transkription komplett zu aktivieren. In 11 von 14 Untereinheiten konnten im Bereich von 250 bp *upstream* des Translationsstartpunktes gemeinsame Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert werden. Darunter sind zum Beispiel der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-responsive transcriptional enhancer-binding protein*), der cAMP abhängig seine Zielgene aktiviert, oder RFX1 (*X-box binding protein 1*), der unter anderen mit einem Element des MHC II-Promotor interagiert und als Aktivator fungiert (Hoeffler, et al., 1988; Reith, et al., 1990; Daten nicht gezeigt). Ein anderer Transkriptionsfaktor wurde kürzlich mit der konzertierten Stimulation proteasomaler Gene in Verbindung gebracht. Der unter anderen im Fettstoffwechsel involvierte Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  (*Peroxisome proliferator activated-receptor alpha*), induziert proteasomale Gene unabhängig von Nrf2 (Anderson, et al., 2004). Dieser Transkriptionsfaktor wird außerdem durch das Proteasom abgebaut (Blanquart, et al., 2002). Allerdings konnte nur in 6 der 14 proteasomalen Gene ein von PPAR $\alpha$  angesprochenes Element identifiziert werden, obwohl alle 14 Gene hochreguliert wurden (Anderson, et al., 2004). Offensichtlich sind noch einige Regulationsmechanismen bei der Proteasom-Genexpression aufzuklären. Anscheinend gibt es mehrere unabhängige noch aufzudeckende Signalwege, über welche die proteasomale Homöostase gesteuert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein wichtiger Schritt für die Aufdeckung eines dieser Mechanismen geleistet.



#### 4.4.1 Ausblick und Bedeutung

Eine Absicherung der bisher erzielten Ergebnisse könnte über ein Reporter-gen-Assay des  $\beta 1(\delta)$  Gens erfolgen. Falls das ARE des  $\beta 1(\delta)$ -Promotors funktional ist, müsste der Promotor sich durch ein Nrf2 aktivierendes Agens wie Dithiolethion (Dick and Kensler, 2002) induzieren lassen. Des Weiteren könnte möglicherweise eine Studie mit Proteasom-Inhibition in einer Nrf2 *knock-out* Mauszelllinie die Vermutungen unterstützen.

Proteasom-Inhibitoren sind bedeutende Substanzen in der Krebsforschung geworden (zusammengefasst in (Adams, 2004)). An dieser Stelle kann die medizinische Relevanz der hier vorgelegten Ergebnisse diskutiert werden. Die Wirkung der Proteasom-Inhibitoren in der Tumor-Therapie ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die letale Konzentration von Proteasom-Inhibitor bei Krebszellen geringer ist, als es bei gesunden Zellen der Fall ist. Aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse ist die Ursache dafür vermutlich ein fehlender *feedback*-Mechanismus. Die in vorliegender Arbeit erzielten Ergebnisse sind wichtige Erkenntnisse in der Aufklärung des Mechanismus von Proteasom-Inhibitoren, welche in der Krebs-Therapie eingesetzt werden. Die molekularen Grundlagen, die dem Mechanismus zu Grunde liegen, könnten in Zukunft eine wichtige Rolle spielen.

## 5 Anhang

### Literaturverzeichnis

- Adams, J. (2004): The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer Cell* (vol. 5), No. 5, pp. 417-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15144949](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15144949)
- Adams, J.; Behnke, M.; Chen, S.; Cruickshank, A. A.; Dick, L. R.; Grenier, L.; Klunder, J. M.; Ma, Y. T.; Plamondon, L. and Stein, R. L. (1998): Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorg Med Chem Lett* (vol. 8), No. 4, pp. 333-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9871680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9871680)
- An, J.; Sun, Y.; Fisher, M. and Rettig, M. B. (2004): Antitumor effects of bortezomib (PS-341) on primary effusion lymphomas, *Leukemia* (vol. 18), No. 10, pp. 1699-704. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15343345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15343345)
- Anderson, S. P.; Howroyd, P.; Liu, J.; Qian, X.; Bahnmann, R.; Swanson, C.; Kwak, M. K.; Kensler, T. W. and Corton, J. C. (2004): The transcriptional response to a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) agonist includes increased expression of proteome maintenance genes, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15375163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15375163)
- Bach, E. A.; Aguet, M. and Schreiber, R. D. (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling, *Annu Rev Immunol* (vol. 15), pp. 563-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9143700](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9143700)
- Bailey, J. L.; Wang, X.; England, B. K.; Price, S. R.; Ding, X. and Mitch, W. E. (1996): The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway, *J Clin Invest* (vol. 97), No. 6, pp. 1447-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8617877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8617877)
- Baracos, V. E.; DeVivo, C.; Hoyle, D. H. and Goldberg, A. L. (1995): Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma, *Am J Physiol* (vol. 268), No. 5 Pt 1, pp. E996-1006. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7539218](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7539218)
- Barton, L. F.; Cruz, M.; Rangwala, R.; Deepe, G. S., Jr. and Monaco, J. J. (2002): Regulation of Immunoproteasome Subunit Expression In Vivo Following Pathogenic Fungal Infection, *J Immunol* (vol. 169), No. 6, pp. 3046-3052. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12144444](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12144444)

- Citation&list\_uids=12218120
- Becskei, A. and Serrano, L. (2000): Engineering stability in gene networks by autoregulation, *Nature* (vol. 405), No. 6786, pp. 590-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10850721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10850721)
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 33, pp. 20313-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9252331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9252331)
- Blanquart, C.; Barbier, O.; Fruchart, J. C.; Staels, B. and Glineur, C. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha ) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 40, pp. 37254-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12118000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12118000)
- Bloom, D. A. and Jaiswal, A. K. (2003): Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I $\kappa$ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 45, pp. 44675-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12947090](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12947090)
- Bochtler, M.; Ditzel, L.; Groll, M. and Huber, R. (1997): Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 12, pp. 6070-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9177170](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9177170)
- Bogyo, M.; McMaster, J. S.; Gaczynska, M.; Tortorella, D.; Goldberg, A. L. and Ploegh, H. (1997): Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 13, pp. 6629-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9192616](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9192616)
- Braun, S.; Hanselmann, C.; Gassmann, M. G.; auf dem Keller, U.; Born-Berclaz, C.; Chan, K.; Kan, Y. W. and Werner, S. (2002): Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 15, pp. 5492-505. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12101242](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12101242)
- Breitschopf, K.; Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2000): Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 28, pp. 21648-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10801801](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10801801)

- Brennan, C. M. and Steitz, J. A. (2001): HuR and mRNA stability, *Cell Mol Life Sci* (vol. 58), No. 2, pp. 266-77.
- Brucet, M.; Marques, L.; Sebastian, C.; Lloberas, J. and Celada, A. (2004): Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1, *Genes Immun* (vol. 5), No. 1, pp. 26-35. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14735146](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14735146)
- Burri, L.; Hockendorff, J.; Boehm, U.; Klamp, T.; Dohmen, R. J. and Levy, F. (2000): Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 19, pp. 10348-53. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/97/19/10348>  
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/97/19/10348>
- Bush, K. T.; Goldberg, A. L. and Nigam, S. K. (1997): Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 14, pp. 9086-92.
- Cagney, G.; Uetz, P. and Fields, S. (2001): Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome, *Physiol Genomics* (vol. 7), No. 1, pp. 27-34. URL: <http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/7/1/27>  
<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/abstract/7/1/27>
- Chang, C.; Gonzalez, F.; Roethermel, B.; Sun, L.; Johnston, S. A. and Kodadek, T. (2001): The Gal4 activation domain binds Sug2 protein, a proteasome component, in vivo and in vitro, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 33, pp. 30956-63. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/276/33/30956>  
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/276/33/30956>
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1996): Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly, *Cell* (vol. 86), No. 6, pp. 961-72.
- Chesler, D. A.; McCutcheon, J. A. and Reiss, C. S. (2004): Posttranscriptional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression by IFN-gamma, *J Interferon Cytokine Res* (vol. 24), No. 2, pp. 141-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14980078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14980078)
- Chu, S.; Blaisdell, C. J.; Bamford, P. and Ferro, T. J. (2004): Interferon-gamma regulates ClC-2 chloride channel in lung epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 324), No. 1, pp. 31-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15464978](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15464978)
- Coux, O.; Tanaka, K. and Goldberg, A. L. (1996): Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes, *Annu Rev Biochem* (vol. 65), pp. 801-47.
- Cullinan, S. B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R. J. and Diehl, J. A. (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 20, pp. 7198-209. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14517290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14517290)
- Dahlmann, B.; Kopp, F.; Kuehn, L.; Nidel, B.; Pfeifer, G.; Hegerl, R. and Baumeister, W. (2003): The 20S proteasome: a molecular machine for protein degradation, *Cell* (vol. 113), No. 2, pp. 171-180.

- W. (1989): The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria, *FEBS Lett* (vol. 251), No. 1-2, pp. 125-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2502434](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2502434)
- Deroo, B. J. and Archer, T. K. (2002): Proteasome inhibitors reduce luciferase and beta-galactosidase activity in tissue culture cells, *J Biol Chem*. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/C200173200v1>
- Dick, L. R.; Cruikshank, A. A.; Grenier, L.; Melandri, F. D.; Nunes, S. L. and Stein, R. L. (1996): Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 13, pp. 7273-6.
- Dick, R. A. and Kensler, T. W. (2002): Chemoprotective potential of phase 2 enzyme inducers, *Expert Rev Anticancer Ther* (vol. 2), No. 5, pp. 581-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12382526](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12382526)
- Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M. and Talalay, P. (2002): Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 18, pp. 11908-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12193649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12193649)
- Drexler, H. C. (1998): Programmed cell death and the proteasome, *Apoptosis* (vol. 3), No. 1, pp. 1-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14646512](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14646512)
- Du, J.; Mitch, W. E.; Wang, X. and Price, S. R. (2000): Glucocorticoids induce proteasome C3 subunit expression in L6 muscle cells by opposing the suppression of its transcription by NF-kappa B, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 26, pp. 19661-6.
- Dubiel, W.; Pratt, G.; Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992): Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease, *J Biol Chem* (vol. 267), No. 31, pp. 22369-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1429590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1429590)
- Durrant, D.; Liu, J.; Yang, H. S. and Lee, R. M. (2004): The bortezomib-induced mitochondrial damage is mediated by accumulation of active protein kinase C-delta, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 321), No. 4, pp. 905-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15358112](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15358112)
- Edgell, C. J.; McDonald, C. C. and Graham, J. B. (1983): Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 80), No. 12, pp. 3734-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6407019](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6407019)
- Elbirt, K. K.; Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. and Bonkovsky, H. L. (1998): Mechanism of

- sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 15, pp. 8922-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9535875](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9535875)
- Eleuteri, A. M.; Cuccioloni, M.; Bellesi, J.; Lupidi, G.; Fioretti, E. and Angeletti, M. (2002): Interaction of Hsp90 with 20S proteasome: thermodynamic and kinetic characterization, *Proteins* (vol. 48), No. 2, pp. 169-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12112686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12112686)
- Fenteany, G.; Standaert, R. F.; Lane, W. S.; Choi, S.; Corey, E. J. and Schreiber, S. L. (1995): Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin, *Science* (vol. 268), No. 5211, pp. 726-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7732382](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7732382)
- Fenteany, G.; Standaert, R. F.; Reichard, G. A.; Corey, E. J. and Schreiber, S. L. (1994): A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 8, pp. 3358-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8159752](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8159752)
- Foss, G. S. and Prydz, H. (1999): Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 49, pp. 35196-202. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/full/274/49/35196>  
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/274/49/35196>
- Frentzel, S.; Kuhn-Hartmann, I.; Gernold, M.; Gott, P.; Seelig, A. and Kloetzel, P. M. (1993): The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated, *Eur J Biochem* (vol. 216), No. 1, pp. 119-26. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8365398](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8365398)
- Frentzel, S.; Pesold-Hurt, B.; Seelig, A. and Kloetzel, P. M. (1994): 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes, *J Mol Biol* (vol. 236), No. 4, pp. 975-81.
- Frentzel, S.; Troxell, M.; Haass, C.; Pesold-Hurt, B.; Glatzer, K. H. and Kloetzel, P. M. (1992): Molecular characterization of the genomic regions of the *Drosophila* alpha-type subunit proteasome genes PROS-Dm28.1 and PROS-Dm35, *Eur J Biochem* (vol. 205), No. 3, pp. 1043-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1374331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1374331)
- Gerards, W. L.; de Jong, W. W.; Bloemendal, H. and Boelens, W. (1998): The human

- proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits, *J Mol Biol* (vol. 275), No. 1, pp. 113-21.
- Gerards, W. L.; Enzlin, J.; Haner, M.; Hendriks, I. L.; Aepli, U.; Bloemendal, H. and Boelens, W. (1997): The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 15, pp. 10080-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9092552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9092552)
- Gille, C.; Goede, A.; Schloetelburg, C.; Preissner, R.; Kloetzel, P. M.; Gobel, U. B. and Frommel, C. (2003): A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome, *J Mol Biol* (vol. 326), No. 5, pp. 1437-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12595256](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12595256)
- Glas, R.; Bogoy, M.; McMaster, J. S.; Gaczynska, M. and Ploegh, H. L. (1998): A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function, *Nature* (vol. 392), No. 6676, pp. 618-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9560160](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9560160)
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Baumeister, W.; Fried, V. A. and Finley, D. (1998): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* (vol. 94), No. 5, pp. 615-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9741626](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9741626)
- Glynne, R.; Kerr, L. A.; Mockridge, I.; Beck, S.; Kelly, A. and Trowsdale, J. (1993): The major histocompatibility complex-encoded proteasome component LMP7: alternative first exons and post-translational processing, *Eur J Immunol* (vol. 23), No. 4, pp. 860-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8458375](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8458375)
- Gottesman, S. (1996): Proteases and their targets in *Escherichia coli*, *Annu Rev Genet* (vol. 30), pp. 465-506. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8982462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8982462)
- Grewal, S. I. and Moazed, D. (2003): Heterochromatin and epigenetic control of gene expression, *Science* (vol. 301), No. 5634, pp. 798-802. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12907790](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12907790)
- Griffin, T. A.; Slack, J. P.; McCluskey, T. S.; Monaco, J. J. and Colbert, R. A. (2000): Identification of proteasemblin, a mammalian homologue of the yeast protein, Ump1p, that is required for normal proteasome assembly, *Mol Cell Biol Res Commun* (vol. 3), No. 4, pp. 212-7.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Lowe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D. and Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* (vol.

- 386), No. 6624, pp. 463-71.
- Groll, M.; Nazif, T.; Huber, R. and Bogoy, M. (2002): Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome, *Chem Biol* (vol. 9), No. 5, pp. 655-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12031672](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12031672)
- Grzybowska, E. A.; Wilczynska, A. and Siedlecki, J. A. (2001): Regulatory functions of 3'UTRs, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 288), No. 2, pp. 291-5.
- Guhaniyogi, J. and Brewer, G. (2001): Regulation of mRNA stability in mammalian cells, *Gene* (vol. 265), No. 1-2, pp. 11-23.
- Hanada, M.; Sugawara, K.; Kaneta, K.; Toda, S.; Nishiyama, Y.; Tomita, K.; Yamamoto, H.; Konishi, M. and Oki, T. (1992): Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin, *J Antibiot (Tokyo)* (vol. 45), No. 11, pp. 1746-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1468981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1468981)
- Hayashi, M.; Ishibashi, T.; Tanaka, K. and Kasahara, M. (1997): The mouse genes encoding the third pair of beta-type proteasome subunits regulated reciprocally by IFN-gamma: structural comparison, chromosomal localization, and analysis of the promoter, *J Immunol* (vol. 159), No. 6, pp. 2760-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9300697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9300697)
- Heinemeyer, W.; Fischer, M.; Krimmer, T.; Stachon, U. and Wolf, D. H. (1997): The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 40, pp. 25200-9.
- Heinemeyer, W.; Trondle, N.; Albrecht, G. and Wolf, D. H. (1994): PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core, *Biochemistry* (vol. 33), No. 40, pp. 12229-37. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7918444](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7918444)
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992): The ubiquitin system for protein degradation, *Annu Rev Biochem* (vol. 61), pp. 761-807. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1323239](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1323239)
- Hoeffler, J. P.; Meyer, T. E.; Yun, Y.; Jameson, J. L. and Habener, J. F. (1988): Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA, *Science* (vol. 242), No. 4884, pp. 1430-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2974179](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2974179)
- Hu, J.; Meng, Q.; Roy, S. K.; Raha, A.; Zhang, J.; Hashimoto, K. and Kalvakolanu, D. V. (2002): A novel transactivating factor that regulates interferon-gamma-dependent gene expression, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 33, pp. 30253-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12050152](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12050152)
- Huang, H. C.; Nguyen, T. and Pickett, C. B. (2000): Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-



- related factor 2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 23, pp. 12475-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11035812](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11035812)
- Huang, H. C.; Nguyen, T. and Pickett, C. B. (2002): Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 45, pp. 42769-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12198130](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12198130)
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (vol. 147), No. 927, pp. 258-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13465720](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13465720)
- Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 236), No. 2, pp. 313-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9240432](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9240432)
- Itoh, K.; Igarashi, K.; Hayashi, N.; Nishizawa, M. and Yamamoto, M. (1995): Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 8, pp. 4184-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7623813](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7623813)
- Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D. and Yamamoto, M. (1999): Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev* (vol. 13), No. 1, pp. 76-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9887101](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9887101)
- Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; O'Connor, T. and Yamamoto, M. (2003): Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles, *Genes Cells* (vol. 8), No. 4, pp. 379-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12653965](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12653965)
- Jager, S.; Groll, M.; Huber, R.; Wolf, D. H. and Heinemeyer, W. (1999): Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function, *J Mol Biol* (vol. 291), No. 4, pp. 997-1013.
- Jayarapu, K. and Griffin, T. A. (2004): Protein-protein interactions among human 20S proteasome subunits and proteasassemblin, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 314), No. 2, pp. 523-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14733938](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14733938)
- Ju, D.; Wang, L.; Mao, X. and Xie, Y. (2004): Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit, *Biochem Biophys Res Commun* (vol.

- 321), No. 1, pp. 51-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15358214](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15358214)
- Ju, D. and Xie, Y. (2004): Proteasomal Degradation of RPN4 via Two Distinct Mechanisms, Ubiquitin-dependent and -independent, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 23, pp. 23851-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15090546](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15090546)
- Kang, K. W.; Lee, S. J.; Park, J. W. and Kim, S. G. (2002): Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress, *Mol Pharmacol* (vol. 62), No. 5, pp. 1001-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12391262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12391262)
- Kawazoe, Y.; Nakai, A.; Tanabe, M. and Nagata, K. (1998): Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family, *Eur J Biochem* (vol. 255), No. 2, pp. 356-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9716376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9716376)
- Kim, D.; Kim, S. H. and Li, G. C. (1999): Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 254), No. 1, pp. 264-8.
- Kloetzel, P. M. (2001): Antigen processing by the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 2), No. 3, pp. 179-87. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11265247](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11265247)
- Kondagunta, G. V.; Drucker, B.; Schwartz, L.; Bacik, J.; Marion, S.; Russo, P.; Mazumdar, M. and Motzer, R. J. (2004): Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma, *J Clin Oncol* (vol. 22), No. 18, pp. 3720-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15365068](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15365068)
- Kruger, E.; Kloetzel, P. M. and Enenkel, C. (2001): 20S proteasome biogenesis, *Biochimie* (vol. 83), No. 3-4, pp. 289-93.
- Kruger, E.; Kuckelkorn, U.; Sijts, A. and Kloetzel, P. M. (2003): The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (vol. 148), pp. 81-104. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12687403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12687403)
- Kruger, E.; Zuhlke, D.; Witt, E.; Ludwig, H. and Hecker, M. (2001): Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor, *Embo J* (vol. 20), No. 4, pp. 852-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11179229](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11179229)
- Kuckelkorn, U.; Knuehl, C.; Boes-Fabian, B.; Drung, I. and Kloetzel, P. M. (2000): The effect of heat shock on 20S/26S proteasomes, *Biol Chem* (vol. 381), No. 9-10,

- pp. 1017-23.
- Kwak, M. K.; Itoh, K.; Yamamoto, M. and Kensler, T. W. (2002): Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 9, pp. 2883-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11940647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11940647)
- Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Greenlaw, J. L.; Yamamoto, M. and Kensler, T. W. (2003): Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 23, pp. 8786-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14612418](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14612418)
- Kwon, Y. D.; Nagy, I.; Adams, P. D.; Baumeister, W. and Jap, B. K. (2004): Crystal Structures of the Rhodococcus Proteasome with and without its Pro-peptides: Implications for the Role of the Pro-peptide in Proteasome Assembly, *J Mol Biol* (vol. 335), No. 1, pp. 233-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14659753](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14659753)
- La Volpe, A.; Ciaramella, M. and Bazzicalupo, P. (1988): Structure, evolution and properties of a novel repetitive DNA family in *Caenorhabditis elegans*, *Nucleic Acids Res* (vol. 16), No. 17, pp. 8213-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3419918](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3419918)
- Le Hir, H.; Nott, A. and Moore, M. J. (2003): How introns influence and enhance eukaryotic gene expression, *Trends Biochem Sci* (vol. 28), No. 4, pp. 215-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12713906](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12713906)
- Lee, D. H. and Goldberg, A. L. (1998): Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* (vol. 18), No. 1, pp. 30-8.
- Lee, J. M.; Hanson, J. M.; Chu, W. A. and Johnson, J. A. (2001): Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 23, pp. 20011-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11274155](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11274155)
- Levine, T. D.; Gao, F.; King, P. H.; Andrews, L. G. and Keene, J. D. (1993): Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 6, pp. 3494-504. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8497264](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8497264)
- Li, B. and Dou, Q. P. (2000): Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 8, pp. 3850-5. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10725400](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10725400)
- Li, Y. and Jaiswal, A. K. (1992): Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element, *J Biol Chem* (vol. 267), No. 21, pp. 15097-104. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1340765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1340765)
- Lopes, U. G.; Erhardt, P.; Yao, R. and Cooper, G. M. (1997): p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 20, pp. 12893-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9148891](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9148891)
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W. and Huber, R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution, *Science* (vol. 268), No. 5210, pp. 533-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7725097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7725097)
- Ma, C. P.; Willy, P. J.; Slaughter, C. A. and DeMartino, G. N. (1993): PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus, *J Biol Chem* (vol. 268), No. 30, pp. 22514-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8226760](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8226760)
- Macagno, A.; Kuehn, L.; de Giuli, R. and Groettrup, M. (2001): Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation, *Eur J Immunol* (vol. 31), No. 11, pp. 3271-80.
- Makino, Y.; Yoshida, T.; Yogosawa, S.; Tanaka, K.; Muramatsu, M. and Tamura, T. A. (1999): Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120, *Genes Cells* (vol. 4), No. 9, pp. 529-39.
- Mannhaupt, G.; Schnall, R.; Karpov, V.; Vetter, I. and Feldmann, H. (1999): Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast, *FEBS Lett* (vol. 450), No. 1-2, pp. 27-34.
- Masson, P.; Lundgren, J. and Young, P. (2003): Drosophila Proteasome Regulator REGgamma: Transcriptional Activation by DNA Replication-related Factor DREF and Evidence for a Role in Cell Cycle Progression, *J Mol Biol* (vol. 327), No. 5, pp. 1001-12. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12662925](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12662925)
- McCord, J. M. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am J Med* (vol. 108), No. 8, pp. 652-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10856414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10856414)
- McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M. and Hayes, J. D. (2003): Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative

- regulation of antioxidant response element-driven gene expression, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 24, pp. 21592-600. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12682069](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12682069)
- Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12676932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676932)
- Meiners, S.; Laule, M.; Rother, W.; Guenther, C.; Prauka, I.; Muschick, P.; Baumann, G.; Kloetzel, P. M. and Stangl, K. (2002): Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis, *Circulation* (vol. 105), No. 4, pp. 483-9. URL: <http://www.circulationaha.org/cgi/content/full/105/4/483>  
<http://www.circulationaha.org/cgi/content/abstract/105/4/483>
- Meng, L.; Mohan, R.; Kwok, B. H.; Elofsson, M.; Sin, N. and Crews, C. M. (1999): Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 18, pp. 10403-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10468620](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10468620)
- Mitch, W. E.; Bailey, J. L.; Wang, X.; Jurkovitz, C.; Newby, D. and Price, S. R. (1999): Evaluation of signals activating ubiquitin-proteasome proteolysis in a model of muscle wasting, *Am J Physiol* (vol. 276), No. 5 Pt 1, pp. C1132-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10329962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10329962)
- Morito, N.; Yoh, K.; Itoh, K.; Hirayama, A.; Koyama, A.; Yamamoto, M. and Takahashi, S. (2003): Nrf2 regulates the sensitivity of death receptor signals by affecting intracellular glutathione levels, *Oncogene* (vol. 22), No. 58, pp. 9275-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14681686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14681686)
- Motohashi, H.; Katsuoka, F.; Engel, J. D. and Yamamoto, M. (2004): Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 101), No. 17, pp. 6379-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15087497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15087497)
- Mullapudi, S.; Pullan, L.; Bishop, O. T.; Khalil, H.; Stoops, J. K.; Beckmann, R.; Kloetzel, P. M.; Krueger, E. and Penczek, P. A. (2004): Rearrangement of the 16S precursor subunits is essential for the formation of the active 20S proteasome, *Biophys J*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15361411](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15361411)
- Nandi, D.; Woodward, E.; Ginsburg, D. B. and Monaco, J. J. (1997): Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits, *Embo J* (vol. 16), No. 17, pp. 5363-75.

- Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Huang, H. C.; Yang, C. S. and Pickett, C. B. (2003): Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 7, pp. 4536-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12446695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12446695)
- Numazawa, S. and Yoshida, T. (2004): Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect, *J Toxicol Sci* (vol. 29), No. 2, pp. 81-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15206576](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15206576)
- Oguro, T.; Hayashi, M.; Nakajo, S.; Numazawa, S. and Yoshida, T. (1998): The expression of heme oxygenase-1 gene responded to oxidative stress produced by phorone, a glutathione depletor, in the rat liver; the relevance to activation of c-jun n-terminal kinase, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 287), No. 2, pp. 773-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9808709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9808709)
- Omura, S.; Fujimoto, T.; Otoguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H. and Sasaki, Y. (1991): Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells, *J Antibiot (Tokyo)* (vol. 44), No. 1, pp. 113-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1848215](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1848215)
- Omura, S.; Matsuzaki, K.; Fujimoto, T.; Kosuge, K.; Furuya, T.; Fujita, S. and Nakagawa, A. (1991): Structure of lactacystin, a new microbial metabolite which induces differentiation of neuroblastoma cells, *J Antibiot (Tokyo)* (vol. 44), No. 1, pp. 117-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2001981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2001981)
- Orlowski, M. (1990): The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system, *Biochemistry* (vol. 29), No. 45, pp. 10289-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2175651](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2175651)
- Ostrowska, H.; Wojcik, C.; Omura, S. and Worowski, K. (1997): Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 234), No. 3, pp. 729-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9175783](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9175783)
- Otterbein, L. E.; Bach, F. H.; Alam, J.; Soares, M.; Tao Lu, H.; Wysk, M.; Davis, R. J.; Flavell, R. A. and Choi, A. M. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway, *Nat Med* (vol. 6), No. 4, pp. 422-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10742149](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10742149)
- Park, I. N.; Cho, I. J. and Kim, S. G. (2004): Ceramide negatively regulates glutathione S-transferase gene transactivation via repression of hepatic nuclear factor-1 that is degraded by the ubiquitin proteasome system, *Mol Pharmacol* (vol. 65), No. 6,

- p. 1475-84. URL:
- 
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15155840](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15155840)
- 
- Peng, S. S.; Chen, C. Y.; Xu, N. and Shyu, A. B. (1998): RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein,
- Embo J*
- (vol. 17), No. 12, pp. 3461-70. URL:
- <http://www.emboj.org/cgi/content/full/17/12/3461>
- 
- Penner, G.; Gang, G.; Sun, X.; Wray, C. and Hasselgren, P. O. (2002): C/EBP DNA-binding activity is upregulated by a glucocorticoid-dependent mechanism in septic muscle,
- Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
- (vol. 282), No. 2, pp. R439-44. URL:
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11792653](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11792653)
- 
- Player, M. R. and Torrence, P. F. (1998): The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation,
- Pharmacol Ther*
- (vol. 78), No. 2, pp. 55-113. URL:
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9623881](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9623881)
- 
- Price, S. R. (2003): Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy,
- Int J Biochem Cell Biol*
- (vol. 35), No. 5, pp. 617-28. URL:
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12672454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12672454)
- 
- Price, S. R.; Bailey, J. L.; Wang, X.; Jurkovitz, C.; England, B. K.; Ding, X.; Phillips, L. S. and Mitch, W. E. (1996): Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription,
- J Clin Invest*
- (vol. 98), No. 8, pp. 1703-8.
- 
- Pritts, T. A.; Hungness, E. S.; Hershko, D. D.; Robb, B. W.; Sun, X.; Luo, G. J.; Fischer, J. E.; Wong, H. R. and Hasselgren, P. O. (2002): Proteasome inhibitors induce heat shock response and increase IL-6 expression in human intestinal epithelial cells,
- Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*
- (vol. 282), No. 4, pp. R1016-26. URL:
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11893605](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893605)
- 
- Ramana, C. V.; Gil, M. P.; Schreiber, R. D. and Stark, G. R. (2002): Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling,
- Trends Immunol*
- (vol. 23), No. 2, pp. 96-101. URL:
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11929133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11929133)
- 
- Ramos, P. C.; Hockendorff, J.; Johnson, E. S.; Varshavsky, A. and Dohmen, R. J. (1998): Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly,
- Cell*
- (vol. 92), No. 4, pp. 489-99.
- 
- Ramos, P. C.; Marques, A. J.; London, M. K. and Dohmen, R. J. (2004): Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes,
- J Biol Chem*
- (vol. 279), No. 14, pp. 14323-30. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14722099](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14722099)
- Reith, W.; Herrero-Sanchez, C.; Kobr, M.; Silacci, P.; Berte, C.; Barras, E.; Fey, S. and Mach, B. (1990): MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain, *Genes Dev* (vol. 4), No. 9, pp. 1528-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2253877](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2253877)
- Rivett, A. J. (1989): The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities, *J Biol Chem* (vol. 264), No. 21, pp. 12215-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2745438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2745438)
- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D. and Goldberg, A. L. (1994): Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules, *Cell* (vol. 78), No. 5, pp. 761-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8087844](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8087844)
- Rushmore, T. H.; King, R. G.; Paulson, K. E. and Pickett, C. B. (1990): Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 87), No. 10, pp. 3826-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2160079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2160079)
- Rushmore, T. H.; Morton, M. R. and Pickett, C. B. (1991): The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity, *J Biol Chem* (vol. 266), No. 18, pp. 11632-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1646813](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1646813)
- Sambrook, P. N.; Cohen, M. L.; Eisman, J. A.; Pocock, N. A.; Champion, G. D. and Yeates, M. G. (1989): Effects of low dose corticosteroids on bone mass in rheumatoid arthritis: a longitudinal study, *Ann Rheum Dis* (vol. 48), No. 7, pp. 535-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2774695](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2774695)
- Sampath, P.; Mazumder, B.; Seshadri, V. and Fox, P. L. (2003): Transcript-selective translational silencing by gamma interferon is directed by a novel structural element in the ceruloplasmin mRNA 3' untranslated region, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 5, pp. 1509-19. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12588972](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12588972)
- Sampath, P.; Mazumder, B.; Seshadri, V.; Gerber, C. A.; Chavatte, L.; Kinter, M.; Ting, S. M.; Dignam, J. D.; Kim, S.; Driscoll, D. M. and Fox, P. L. (2004): Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of



- translation, *Cell* (vol. 119), No. 2, pp. 195-208. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15479637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15479637)
- Schmidtke, G.; Kraft, R.; Kostka, S.; Henklein, P.; Frommel, C.; Lowe, J.; Huber, R.; Kloetzel, P. M. and Schmidt, M. (1996): Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis, *Embo J* (vol. 15), No. 24, pp. 6887-98.
- Schmidtke, G.; Schmidt, M. and Kloetzel, P. M. (1997): Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes, *J Mol Biol* (vol. 268), No. 1, pp. 95-106.
- Seemuller, E.; Lupas, A. and Baumeister, W. (1996): Autocatalytic processing of the 20S proteasome, *Nature* (vol. 382), No. 6590, pp. 468-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8684489](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8684489)
- Sekhar, K. R.; Yan, X. X. and Freeman, M. L. (2002): Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2, *Oncogene* (vol. 21), No. 44, pp. 6829-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12360409](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12360409)
- Shah, M. H.; Young, D.; Kindler, H. L.; Webb, I.; Kleiber, B.; Wright, J. and Grever, M. (2004): Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors, *Clin Cancer Res* (vol. 10), No. 18 Pt 1, pp. 6111-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15447997](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15447997)
- Shang, L. L. and Dudley, S. C., Jr. (2004): Tandem promoters and developmentally regulated 5' and 3' mRNA untranslated regions of the mouse scn5a cardiac sodium channel, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15485820](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15485820)
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986): A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation, *Cell* (vol. 46), No. 5, pp. 659-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3488815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3488815)
- Shibata, T.; Imaizumi, T.; Tamo, W.; Matsumiya, T.; Kumagai, M.; Cui, X. F.; Yoshida, H.; Takaya, S.; Fukuda, I. and Satoh, K. (2002): Proteasome inhibitor MG-132 enhances the expression of interleukin-6 in human umbilical vein endothelial cells: Involvement of MAP/ERK kinase, *Immunol Cell Biol* (vol. 80), No. 3, pp. 226-30.
- Snyder, S. R.; Waring, J. F.; Zhu, S. Z.; Kaplan, S.; Schultz, J. and Ginder, G. D. (2001): A 3'-transcribed region of the HLA-A2 gene mediates posttranscriptional stimulation by IFN-gamma, *J Immunol* (vol. 166), No. 6, pp. 3966-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11238642](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11238642)
- Stadtman, E. R. (1990): Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical

- mechanism and biological consequences, *Free Radic Biol Med* (vol. 9), No. 4, pp. 315-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2283087](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2283087)
- Stewart, D.; Killeen, E.; Naquin, R.; Alam, S. and Alam, J. (2003): Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 4, pp. 2396-402. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12441344](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12441344)
- Talalay, P.; Dinkova-Kostova, A. T. and Holtzclaw, W. D. (2003): Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis, *Adv Enzyme Regul* (vol. 43), pp. 121-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12791387](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12791387)
- Tamura, T.; Osaka, F.; Kawamura, Y.; Higuti, T.; Ishida, N.; Nothwang, H. G.; Tsurumi, C.; Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994): Isolation and characterization of alpha-type HC3 and beta-type HC5 subunit genes of human proteasomes, *J Mol Biol* (vol. 244), No. 1, pp. 117-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7966316](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7966316)
- Tanahashi, N.; Kawahara, H.; Murakami, Y. and Tanaka, K. (1999): The proteasome-dependent proteolytic system, *Mol Biol Rep* (vol. 26), No. 1-2, pp. 3-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10363639](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10363639)
- Tanaka, K. and Ichihara, A. (1989): Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 159), No. 3, pp. 1309-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2649098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2649098)
- Tasheva, E. S. (2002): Analysis of the promoter region of human mimecan gene, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1575), No. 1-3, pp. 123-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12020827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12020827)
- Tebo, J. M.; Datta, S.; Kishore, R.; Kolosov, M.; Major, J. A.; Ohmori, Y. and Hamilton, T. A. (2000): Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5'- and 3'-untranslated regions, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 17, pp. 12987-93. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10777600](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10777600)
- Tian, S.; Liu, W.; Wu, Y.; Rafi, H.; Segal, A. S. and Desir, G. V. (2002): Regulation of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel KCNA10 by KCNA4B, a novel beta-subunit, *Am J Physiol Renal Physiol* (vol. 283), No. 1, pp. F142-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12060596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12060596)
- Walz, J.; Erdmann, A.; Kania, M.; Typke, D.; Koster, A. J. and Baumeister, W. (1998): 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy, *J Struct Biol* (vol. 121), No. 1, pp. 19-29. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9573617](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9573617)
- Wang, L.; Mao, X.; Ju, D. and Xie, Y. (2004): Rpn4 Is a physiological substrate of the Ubr2 ubiquitin ligase, *J Biol Chem*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15504724](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15504724)
- Waxman, L.; Fagan, J. M. and Goldberg, A. L. (1987): Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates, *J Biol Chem* (vol. 262), No. 6, pp. 2451-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3029081](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3029081)
- Wilkie, G. S.; Dickson, K. S. and Gray, N. K. (2003): Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors, *Trends Biochem Sci* (vol. 28), No. 4, pp. 182-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12713901](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12713901)
- Witt, E.; Zantopf, D.; Schmidt, M.; Kraft, R.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2000): Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes, *J Mol Biol* (vol. 301), No. 1, pp. 1-9.
- Wojcik, C. and DeMartino, G. N. (2001): Analysis of drosophila 26S proteasome using RNA interference, *J Biol Chem*. URL: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M109996200v1>
- Wojcik, C. and DeMartino, G. N. (2002): Analysis of Drosophila 26 S proteasome using RNA interference, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 8, pp. 6188-97. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11739392](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11739392)
- Xie, Y. and Varshavsky, A. (2001): RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 6, pp. 3056-61. URL: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/98/6/3056>  
<http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/98/6/3056>
- Zaiss, D. M.; Standera, S.; Holzhtutter, H.; Kloetzel, P. and Sijs, A. J. (1999): The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes, *FEBS Lett* (vol. 457), No. 3, pp. 333-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10471803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10471803)
- Zhang, D. D. and Hannink, M. (2003): Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 22, pp. 8137-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14585973](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585973)
- Zhou, M.; Wu, X. and Ginsberg, H. N. (1996): Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 40, pp. 24769-75.

- Zuhl, F.; Seemuller, E.; Golbik, R. and Baumeister, W. (1997): Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome, FEBS Lett (vol. 418), No. 1-2, pp. 189-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9414124](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9414124)
- Zwickl, P.; Lottspeich, F. and Baumeister, W. (1992): Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*, FEBS Lett (vol. 312), No. 2-3, pp. 157-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1426246](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1426246)
- Zwickl, P.; Voges, D. and Baumeister, W. (1999): The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci (vol. 354), No. 1389, pp. 1501-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10582236](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10582236)

## Abkürzungsverzeichnis

---

|               |  |
|---------------|--|
| Abb.          | Abbildung                                |
| Acc.-Nr.      | Accession-Nummer                         |
| A. dest       | Aqua destilata; voll entsalztes Wasser   |
| AMC           | 7-Amido-4-Methylcoumarin                 |
| Amp           | Ampicilin                                |
| APS           | Ammoniumpersulfat                        |
| AS            | Aminosäure                               |
| ATP           | Adenosin Triphosphat                     |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid                         |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure                   |
| DTT           | Dithiothreitol                           |
| ECL           | enhanced chemiluminescence               |
| E.coli        | Escherichia coli                         |
| EDTA          | Ethylendiamintetraacetat                 |
| ELISA         | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EMSA          | electrophoretic mobility shift assay     |
| <i>et al.</i> | et alii (und andere, lat.)               |
| EtOH          | Ethanol                                  |
| FKS           | fötales Kälberserum                      |
| g             | Gramm                                    |
| h             | Stunde                                   |
| HEPES         | Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure  |
| Hsp           | Heat Shock Protein                       |
| IP            | Immunpräzipitation                       |
| kb            | kilo Basen                               |
| kDa           | kilo Dalton                              |
| LB            | Luria-Bertani-Medium                     |
| LMP           | low molecular weight protein             |
| M             | molar                                    |

---

|        |   |
|--------|---|
| MECL-1 | multicatalytic endopeptidase complex-like 1 |
| NP-40  | Nonidet P40                                 |
| OD     | Optische Dichte                             |
| PAGE   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese             |
| PBS    | Phosphate buffered saline                   |
| PCR    | Polymerase Kettenreaktion                   |
| RNA    | Ribonukleinsäure                            |
| rpm    | rounds per minute                           |
| RT     | Raumtemperatur                              |
| RLU    | Relative Licht Units                        |
| S      | Svedberg                                    |
| SDS    | Sodium Dodecylsulfat                        |
| TBE    | Tris-Borat-EDTA                             |
| TEMED  | N, N, N', N'-Tetramethyl-p-ethylendiamin    |
| Tris   | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan            |
| UV     | Ultra Violett                               |
| ü.N.   | über Nacht                                  |
| v/v    | Volumen pro Volumen                         |
| VSMC   | vascular smooth muscle cell                 |
| WB     | Western Blot                                |

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Dirk Heyken

Geburtsdatum: 7.4.1975 in Wuppertal

### **Schulausbildung:**

1985 - 1994 Carl-Fuhlrott Gymnasium in Wuppertal  
Abitur

### **Akademische Ausbildung:**

1995 - 2001 Ruhr-Universität in Bochum  
Studium der Biologie

2001 - 2005 Institut für Biochemie am Universitätsklinikum der Charité in Berlin  
Dissertation

## Veröffentlichungen

Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes, J Biol Chem. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12676932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676932)

Posterpräsentation:

5.12.2003: Studententag HU-Berlin:

Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes

26.9.2003-29.9.2003 "Eigenetics" in Kassel:

Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes



## Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit war eine langjährige, sehr intensive aber auch schöne Zeit. Diese Arbeit war aber auch nur durch die vielfältige Unterstützung möglich. An dieser Stelle möchte ich mich dafür recht herzlich bedanken.

Zunächst möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas unter hervorragenden Arbeitsbedingungen bei Professor Peter-Michael Kloetzel bedanken. Vielen Dank für die tollen Rahmenbedingungen und die Möglichkeit an internationalen Fachkongressen teilzunehmen.

Optimale Betreuung wurde durch die stets Hilfsbereite und kompetente Betreuung von Dr. Elke Krüger geschaffen. Die Unterstützung war auch in Zeiten des Mutterschutzes immer hervorragend und fand in einer freundschaftlichen Atmosphäre statt.

Den Arbeitsalltag haben mir meine Kollegen Sylvia Heink, Benjamin Fricke, Carola Beier, Daniela Ludwig und Tobias Schwarz im Labor aufgehellt. Für das gute Arbeitsklima zwischen den Labors sorgten Britta Strehl, Annett Helfrich, Gesa Hoffmann, Nicola Klare Andrea Schulze und Anette Zoeger.

Sylvia Heink bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Danke für das aufmerksame Lesen dieser Arbeit und für die rege Diskussionsbereitschaft an der frischen Luft.

Unverzichtbare Tipps und aufopferungsvolle Hilfsbereitschaft. Das sind die Attribute mit denen man vor allem Ulrike Kuckelkorn's und auch Ulrike Seifert's Anteil an meiner Arbeit hatten. Vielen Dank dafür.

Ich danke meiner Familie sehr. Lyutha für Ihre Liebe, Ihr Verständnis und für die Schaffung des nötigen Freiraums, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Malik danke ich für die herrlichen Augenblicke und für die Ablenkung.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den 20.12.2004

## Urheberrechtshinweis

Inzwischen wurden Passagen dieser Dissertation (Teile der Abbildungen 13 -17) veröffentlicht in

Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes, J Biol Chem. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12676932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676932)

## Copyright notice

In the meantime, passages of this theses ( parts of the figures 13-17) have been published in

Meiners, S.; Heyken, D.; Weller, A.; Ludwig, A.; Stangl, K.; Kloetzel, P. M. and Kruger, E. (2003): Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes, J Biol Chem. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12676932](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12676932)

Velbert, 23.9.2005